

**Aus dem Institut für Klinische Chemie und
Klinische Biochemie an der Universität München
Kommissarischer Leiter: Professor Dr. H. Fritz
und der Abteilung für Andrologie und
Künstliche Besamung an der Gynäkologischen und
Ambulatorischen Tierklinik der Universität München
Vorstand: Professor Dr. W. Leidl**

**BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER
PROTEINASEINHIBITOREN AUS SPERMA
UND GENITALORGANEN VOM EBER**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München**

**von
FRANZ WEBER
aus Regensburg**

1975

München 1974

Aus dem Institut für Klinische Chemie und
Klinische Biochemie an der Universität München
Kommissarischer Leiter: Professor Dr. H. Fritz
und der Abteilung für Andrologie und
Künstliche Besamung an der Gynäkologischen und
Ambulatorischen Tierklinik der Universität München
Vorstand: Professor Dr. W. Leidl

BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER
PROTEINASEINHIBITOREN AUS SPERMA
UND GENITALORGANEN VOM EBER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

von
Franz Weber
aus Regensburg

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. W. Leidl
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. E. Scharrer

Tag der Promotion: 21. Februar 1975



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	2
2.1. Grundlegende Begriffe	2
2.1.1. Morphologie von Spermium und Ovum, "Penetrationsenzyme" und ihre Inhibitoren	2
2.1.2. "Corona penetrating enzyme" (CPE) und Dekapazitationsfaktor (DF)	4
2.2. Akrosin - Charakterisierung und Isolierung	5
2.2.1. Akrosin und Zona pellucida	5
2.2.2. Extraktion und Isolierung	7
2.3. Akrosininhibitoren	8
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	11
3.1. Material für die quantitative Bestimmung der Aktivitäten von Akrosin und von Trypsin-Inhibitor in Spermien bzw. Sekreten und Gewebsextrakten bei Zwergschweinebern	11
3.1.1. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse	13
3.1.2. Genitalgewebe und Inhibitoraktivität	13
3.1.3. Genitalsekrete und Inhibitoraktivität	15
3.1.4. Spermien und Akrosinaktivität	18
3.2. Charakterisierung von Inhibitor aus Nebenhoden	23
3.2.1. Sekretgewinnung	23
3.2.2. Hemmaktivitätsbestimmung	23

	Seite
3.2.3. Säurestabilität des Inhibitors aus spermienfreiem NH-Sekret	23
3.2.4. Fraktionierung von inhibitorhaltigem, spermienfreiem NH-Extrakt	24
3.2.5. Assoziation von Inhibitor aus Schweinespermien (SSI) an epididymale Spermien	25
3.2.6. Fraktionierung von essigsauerm NH-Spermienextrakt	26
3.3. Freisetzung von Inhibitor aus dem Akrosin-Inhibitor-Komplex in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Inkubationszeit	28
3.4. Fraktionierung und Reinigung von Inhibitor aus frischem und 24 Std. altem bzw. 2 Tage bei -40°C gelagertem Schweinespermaplasma aus verschiedenen Ejakulaten	31
3.4.1. Methodik	31
3.4.2. Fraktionierung von frischem Spermaplasma	31
3.4.3. Fraktionierung von Spermaplasma nach 24 stündiger Lagerung bei Raumtemperatur	33
3.4.4. Fraktionierung von Spermaplasma - zu einem Teil 2 Tage bei -40°C eingefroren, zum anderen Teil 24 Std. mit Säure behandelt	35
3.5. Inhibitoraktivität und Fraktionierung von Plasma der Vorphase, der ersten und der zweiten Hauptphase eines Eberejakulats	38
3.6. Anreicherung der Inhibitoren aus Seminalplasma und Rechromatographie der isolierten Unterfraktionen	41
3.6.1. Methodik	41
3.6.2. Quantitative Anreicherung	41
3.6.3. Rechromatographie der Inhibitorfraktionen IIa und IIb	42
3.6.3.1. Fraktion IIa	42
3.6.3.2. Fraktion IIb	44

	Seite
3.7. Vergleich der Hemmspektren der Inhibitoren aus Seminalplasma und Spermien	46
4. DISKUSSION	48
5. ZUSAMMENFASSUNG	54
6. LITERATURVERZEICHNIS	58
LEBENS LAUF	66

1. EINLEITUNG

In den letzten Jahren ist es gelungen, einzelne Schritte des Befruchtungsvorgangs biochemisch aufzuklären. Diese Erfolge, die neue Möglichkeiten der Kontrazeption aufzeigen, haben die Forschung auf dem Gebiete der Fertilisation stark stimuliert.

Eine entscheidende Funktion beim Eindringen des Spermiums in das Ovum wird nach neuesten Erkenntnissen einer Proteinase mit trypsinähnlicher Spaltungsspezifität zugeschrieben. Sie ist neben anderen lysosomalen Enzymen im Akrosom des Spermiums lokalisiert und wurde deshalb von ZANEVELD und Mitarbeitern (1971a) Akrosin genannt. Außerdem konnten aus Seminalplasma von Säugtieren Protein-Proteinase-Inhibitoren isoliert werden, die Akrosin und Trypsin hemmen (ZANEVELD und Mitarbeiter, 1972 a, 1972 b; SCHUMACHER, 1971). Sie dürften beim Befruchtungsvorgang ebenfalls eine wesentliche Rolle spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Verteilung der Inhibitoraktivitäten aus Genitalorganen und deren Sekreten von männlichen Schweinen bestimmt. Zusätzlich wurde dabei der Einfluß der Orchitektomie auf die Inhibitorkonzentration untersucht. Weiterhin interessierte die Frage, ob der im Seminalplasma vorhandene Trypsin-Akrosin-Inhibitor bereits in den epididymalen Sekreten vorkommt und wenn ja, dort bereits an die Spermien adsorbiert ist. Außerdem wurde, vor allem durch die Bestimmung der Molekülgrößen, untersucht, ob die trypsinakrosin hemmende Wirkung auf einen oder mehrere Inhibitoren zurückzuführen ist.

2. LITERATUR

2.1. Grundlegende Begriffe

Die Spermien werden in den Testes gebildet und in der Epididymis gespeichert. Bei der Ejakulation erfolgt der Kontakt zwischen epididymalen Spermien und, unter anderem, dem Sekret der Samenblasendrüsen. Die in Vagina bzw. Uterus abgelagerten Spermien wandern innerhalb 5 bis 10 Minuten durch Zervix und Uterus bis zur Ampulle des Eileiters. Bei einigen Spezies ist nachgewiesen, daß während dieser Wanderung die Spermien kapazitiert werden, d.h., daß sie erst dabei ihr Befruchtungsvermögen erlangen. Die Geschwindigkeit der Kapazitation ist hormonabhängig. Unter Progesteroneinfluß wird die Kapazitation nahezu völlig unterbunden (CHANG, 1958; HAMNER und Mitarbeiter, 1968), Östrogene verkürzen die für die Kapazitation notwendige Zeit (SOUPART, 1967). Epididymale und ejakulierte Spermien, die nicht im weiblichen Genitaltrakt verweilten, also keinen Kontakt mit dessen Sekreten hatten, sind normalerweise nicht befruchtungsfähig (EDWARDS und Mitarbeiter, 1969). Bereits kapazitierte Spermien werden durch Inkubation mit Seminalplasma wieder dekapazitiert. Diese Dekapazitation kann auch durch Inkubation von kapazitierten Spermien mit Akrosininhibitoren erzielt werden (POLAKOSKI und Mitarbeiter, 1972).

2.1.1. Morphologie von Spermium und Ovum, "Penetrationsenzyme" und ihre Inhibitoren.

Im Akrosom des Spermiums sind unter anderem folgende Enzyme lokalisiert (Abb. 1): Hyaluronidase (DOTT und Mitarbeiter, 1969), eine Spermien-Neu-

raminidase (ZANEVELD und Mitarbeiter, 1970), nach ZANEVELD und WILLIAMS (1970) ein "Corona penetrating enzyme" (CPE) sowie Akrosin (STAMBAUGH und BUCKLEY, 1969; ZANEVELD und Mitarbeiter, 1969, 1971 a). Akrosininhibitoren und der Dekapazitationsfaktor (DF) sind im Seminalplasma sowie in ejakulierten Spermien vorhanden (ZANEVELD und Mitarbeiter, 1970).

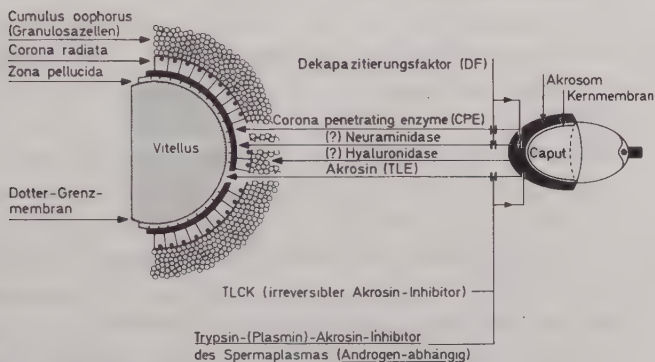


Abb. 1: Schematische Darstellung von Ovum und Spermium mit den Penetrationsenzymen des Akrosoms sowie deren Inhibitoren nach FRITZ und Mitarbeitern (1971).

Eine dicke, lockere Schicht von Granulosazellen stellt die äußere Begrenzung des Eies dar. Sie umhüllt eine wesentlich dünnere Lage von Corona radiata Zellen. Letztere sitzen direkt auf der Zona pellucida, einer Mucoproteinmembran, die als die

widerstandsfähigste Membran des Eies bezeichnet werden kann. Die innerste Begrenzung stellt die Dottergrenzmembran dar.

Kurz bevor beim Befruchtungsvorgang das kapazitierte Spermium mit der Membran der Zona pellucida in Berührung kommt, erfolgt die "Akrosomenreaktion" (BEDFORD, 1969, 1970 a, 1970 b). Dabei löst sich die Akrosomenmembran in kleine Bläschen auf. Die im Akrosom enthaltenen Enzyme werden dadurch frei und öffnen dem Spermium durch ihre lytische Wirkung den Weg durch die Eihülle, insbesondere durch die Zona pellucida.

2.1.2. "Corona penetrating enzyme" (CPE) und Dekapazitationsfaktor (DF)

ZANEVELD und Mitarbeitern (1970) gelang am befruchteten Kaninchenei der Nachweis, daß isoliertes CPE zu einer vollständigen Dispersion der Corona radiata führt. Die Zona pellucida wird dagegen nicht angegriffen. In Gegenwart des Dekapazitationsfaktors, wahrscheinlich eines Polypeptids mit dem Molekulargewicht von etwa 500 (PINSKER und WILLIAMS, 1967), wird die dispergierende Wirkung von CPE fast völlig aufgehoben (CHANG, 1958; WILLIAMS und Mitarbeiter, 1969). Dem DF wird außerdem eine hemmende Wirkung auf die Spermien-Neuraminidase zugeschrieben (ZANEVELD und Mitarbeiter, 1970).

2.1.3. Kapazitation und Dekapazitation

Bei der Ejakulation, d.h. nach dem Kontakt der Spermien mit dem Sekret der Vesikulardrüsen, könnten der Inhibitor und der Dekapazitationsfaktor durch die äußere Akrosomenmembran in das Akrosom diffundieren. Die Triebfeder dafür dürften die ge-

ringen Konzentrationen an freiem Inhibitor und DF innerhalb des Akrosoms sein, da diese durch die Komplexbildung laufend verbraucht werden (ZANEVELD und Mitarbeiter, 1970). Der Dekapazitation würde somit die Blockierung der Akrosinaktivität und der CPE-Aktivität im Akrosom durch Komplexbildung zu Grunde liegen (FRITZ und Mitarbeiter, 1971). Der Kapazitation würde der umgekehrte Vorgang entsprechen. Inhibitor und DF diffundieren während der Wanderung der Spermien im weiblichen Genitaltrakt wieder durch die Akrosomenmembran in das umgebende Milieu, in dem die Konzentration beider Stoffe äußerst gering ist. Es ist jedoch auch möglich, daß Akrosininhibitor und DF nur an den äußeren Akrosomenmembranen adsorbiert werden. Die Abgabe dieser Stoffe bei der Kapazitation wäre dann leichter verständlich (FRITZ und Mitarbeiter, 1971).

2.2. Akrosin - Charakterisierung und Isolierung

Das Vorkommen eines Enzyms mit trypsinähnlicher Spezifität - Trypsin like enzyme (TLE) - in Spermien wurde bereits 1935 von YAMANE und später von BURUIANA (1956) beschrieben. Eine eingehendere Charakterisierung gelang WALDSCHMIDT und Mitarbeitern (1966). Die Lokalisation von TLE im Akrosom haben STAMBAUGH und BUCKLEY (1969) dargestellt. Von ZANEVELD und Mitarbeitern (1971 a) wurde TLE aus Kaninchenspermien isoliert und dafür der Name Akrosin vorgeschlagen.

2.2.1. Akrosin und Zona pellucida

Für die Durchdringung der Zona pellucida des Eies durch kapazitierte Spermien ist im wesentlichen

Akrosin verantwortlich. Dafür sprechen folgende Befunde:

- a) Das dem Akrosin in seiner Wirkspezifität sehr ähnliche Trypsin vermag die Zona pellucida aufzulösen (STAMBAUGH und BUCKLEY, 1969). Die diesbezügliche Trypsinähnlichkeit von Akrosin wird durch den Vergleich folgender Eigenschaften belegt: pH-Optimum, Spaltung von N-alpha-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid (BAPA) und Benzoyl-L-argininäthylester (BAEE), Hemmung der enzymatischen Aktivität durch synthetische Trypsininhibitoren wie 1-Chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone (TLCK) und Diisopropylfluorophosphat (DFP) sowie durch eine Reihe von natürlich vorkommenden Trypsininhibitoren (ZANEVELD und Mitarbeiter, 1971 a).
- b) Die Trypsininhibitoren aus Sojabohnen und Lima-bohnen (DOTT und Mitarbeiter, 1969) und die Trypsin- bzw. Trypsin-Plasmin-Inhibitoren aus Meerschweinchen Samenplasma (HAENDLE und Mitarbeiter, 1970) sind in der Lage, die durch akrosomale Spermienextrakte verursachte Auflösung der Zona pellucida nahezu völlig zu unterbinden. GADDUM und BLANDAU (1970) machten die Lysiswirkung epididymaler Kaninchenspermien auf einer Gelatinemembran sichtbar. Werden die Spermien vor dem Aufbringen auf einer Sojabohnen-Trypsininhibitorlösung inkubiert, so ist die Lysiswirkung drastisch vermindert.
- c) Werden kapazitierte Spermien vor der Insemination in Gegenwart von Trypsin-Inhibitoren inkubiert, so ist ihre Befruchtungsfähigkeit im Vergleich zu kapazitierten, nicht mit Inhibitor behandelten Spermien drastisch vermindert (STAMBAUGH und Mitarbeiter, 1969; ZANEVELD und Mitarbeiter, 1971 b) .

2.2.2. Extraktion und Isolierung

Durch verschiedene Extraktionsverfahren versuchte man, den akrosomalen Inhalt aus den Spermien herauszulösen. HATHEWAY und HARTREE (1963) gelang es, die Akrosomen von Schaf- und Bullenspermien durch mechanische Manipulation abzulösen und ihren Inhalt mit alkalischen Lösungen zu extrahieren. Von STAMBAUGH und BUCKLEY (1969) wurden die Spermien homogenisiert und in Schwanz-, Mittel- und Kopfteil durch Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert. Die Akrosomenkappe wurde von der Kopffraktion unter Detergentieneinwirkung abgelöst. ZANEVELD und Mitarbeiter (1972 a, 1972 b) konnten Akrosin aus Kaninchenspermien stark anreichern. Sie extrahierten epididymale Spermien, die mehrmals gewaschen waren, mit neutralen Detergentien wie Hyamin 2389 und Triton X 100. Die detergentienhaltige Lösung wurde anschließend zur Proteinfällung mit Alkohol versetzt. Der Niederschlag wurde gelöst, dialysiert und lyophilisiert. Die weitere Reinigung erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose, wobei eine für diese Art der Auftrennung nur geringe Anreicherung von Akrosin gelang. Durch Gelfiltration über eine Sephadex G-100 Säule in leicht saurem Milieu (pH=3) erfolgte dann die "Endreinigung". Das von diesen Autoren isolierte Enzym war sehr unbeständig. Bereits eine Minute nach Neutralisation der schwach sauren Akrosinlösung waren 80% der Akrosinaktivität verschwunden.

FINK und Mitarbeiter (1972) sowie FRITZ und Mitarbeiter (1972) fanden, daß Akrosin frischejakulierter Spermien mit Seminalplasmahemagglutininen einen reversiblen Komplex bildet, der erst in saurer Lösung dissoziiert. Sie extrahierten daraufhin die

Akrosomen ejakulierter Eberspermien mit 2%iger Essigsäure (pH 2,6-1,8) und erhielten um 30-40% höhere Akrosinausbeuten als bei Verwendung pufferhaltiger Detergentien. Mit dieser Extraktionsmethode wurden etwa 95 Prozent der gesamten Akrosinaktivität der Spermien erfaßt. Große Spermamengen, wie sie bisher zur Extraktion mit Detergentien benutzt wurden, waren nicht mehr notwendig. Die Akrosinaktivität konnte nun auch im Einzelejakulat bestimmt werden (SCHILL, 1973).

2.3. Akrosininhibitoren

Die von HAENDLE und Mitarbeitern (1965) sowie FRITZ und Mitarbeitern (1968) und unabhängig davon von WALDSCHMIDT und Mitarbeitern (1966) in Vesikulardrüsen und Sperma von Säugetieren gefundenen Trypsininhibitoren (Tab. 1) hemmen Akrosin sehr stark (SCHIESSLER, 1972).

Die bisher beschriebenen Erkenntnisse lassen den Schluß zu, daß diese Akrosininhibitoren beim Befruchtungsvorgang eine wichtige Funktion erfüllen. Sie werden wahrscheinlich spätestens bei der Ejakulation den epididymalen Spermien beigemischt. In dem sich bildenden Akrosin-Inhibitor-Komplex ist die proteolytische Wirkung des Enzyms blockiert. Während der Wanderung durch den weiblichen Genitaltrakt wird dann auf noch nicht geklärte Weise der Inhibitor vom Spermium abgegeben. Das Akrosin ist danach wieder aktiv.

Tab. 1: Trypsininhibitor-Aktivitäten in männlichen Geschlechtsdrüsen (mIU/g) und ihren Sekreten (mIU/ml) nach HAENDLE (1969).

Spezies	Hoden	Epididymis	Vesikular-drüsen	Seminal-plasma
Mensch	70-100	50-80	50-100	150-330
Rind	40-70	50-80	900-1500	2400-3100
Schwein	90-120	70-110	500-1000	800-1200
Schaf	-	-	250-500	-
Ratte	100-200	90-130	1400-1600	-
Maus	90-130	100-200	2200-2700	-
Meerschweinchen	100-220	300-400	3500-5000	-
Hamster	60-90	80-120	300-600	-

Die Synthese der Inhibitoren ist offensichtlich hormonesteuert (HAENDLE und Mitarbeiter, 1965; WERLE und Mitarbeiter, 1968). Sie wird z.B. bei Mäusen durch Testosterongaben stark stimuliert (Abb. 2). Etwa 30 Tage nach der Kastration erreicht die Inhibitorkonzentration in den Samenblasen minimale Werte, um unter Testosteroneinfluß auf ein Vielfaches des Ausgangswertes anzusteigen.

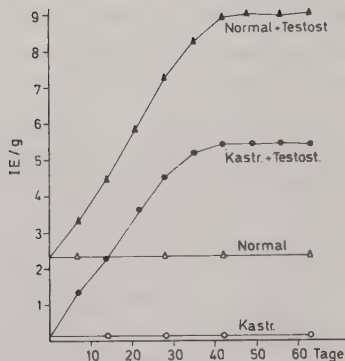


Abb. 2: Inhibitorkonzentration in der Glandula vesicularis der Maus nach HAENDLE und Mitarbeitern (1965) - normal, 30 Tage nach Kastration, sowie unter Stimulierung mit Testosteron. 1 IE hemmt ca. 1 mg Trypsin.

Den Inhibitoren in Spermaplasma, Zervixschleim und anderen Sekreten genitalen Ursprungs wird auch eine Schutzfunktion zugeschrieben (FRITZ und Mitarbeiter, 1971). Eine sehr große Anzahl von Spermien verliert während ihres in-vivo-Daseins im männlichen und weiblichen Genitaltrakt die Akrosomenkappe, nach BEDFORD (1970a) die "zufällige" Akrosomenreaktion genannt. Dabei wird ein beträchtliches proteolytisches Potential freigesetzt, das durch die Inhibitoren rasch und wirksam blockiert werden kann, wodurch eine Schädigung der Schleimhaut oder intakter Spermien u.U. vermieden wird (FRITZ und Mitarbeiter, 1971).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material für die quantitative Bestimmung der Aktivitäten von Akrosin und von Trypsin-Inhibitor in Spermien bzw. Sekreten und Gewebsextrakten bei Zwergschweinebern.

Das Material stammte aus einem Versuch von SCHEFELS und STOLLA (1975). Es standen 18 geschlechtsreife Eber der Rasse Göttinger Zwergschwein zur Verfügung. Sie wurden in 3 Gruppen zu je 6 Tieren eingeteilt. Pro Gruppe wurden Tiere aus mindestens 3 verschiedenen Würfen eingesetzt (Tab. 2).

Gruppe A: Kontrolltiere

Gruppe B: Tiere mit doppelter Ligatur des linken Nebenhodenschwanzes.

Unter Narkose (Stresnil^R, Hypnodil^R) wurde der Nebenhodenschwanz am Übergang zum Nebenhodenkörper und zum Samenleiter unterbunden. Die Tötung der Tiere durch Bolzenschußapparat erfolgte 30 Tage post operationem. Die rechte Seite blieb unbehandelt.

Gruppe C: Tiere mit beidseitiger Orchitektomie und doppelter Ligatur der Nebenhoden (rechts und links). Unter Narkose (wie oben) wurden beide Hoden entfernt, während versucht wurde, die Nebenhoden funktionsfähig im Scrotum zu belassen. Die Nebenhoden wurden in gleicher Weise ligiert wie bei Gruppe B und die Tiere ebenfalls 30 Tage post operationem getötet (wie oben).

^R Eingetragenes Warenzeichen der Firma Janssen, Düsseldorf.

Tab. 2: Tiermaterial⁺ zur quantitativen Bestimmung der Aktivität von Akrosin und von Trypsin-Inhibitor in Spermien bzw. Sekreten und Gewebsextrakten bei Zwergschweinebern.

Geb.Dat.	Alter bei Tötung(Tg.)	Gewicht(kg)
Gruppe A: Kontrolltiere		
7.11.71	284	18
11.11.71	282	24
11.11.71	281	23
23.12.71	280	13
23.12.71	280	9
Gruppe B: Tiere mit doppelter Ligatur des linken Nebenhodenschwanzes		
7.11.71	284	29
7.11.71	284	15
11.11.71	282	20
12.11.71	281	13
12.11.71	281	12
23.12.71	280	10
Gruppe C: Tiere mit beidseitiger Orchitektomie und doppelter Ligatur der beiden Nebenhodenschwänze.		
7.11.71	284	27
11.11.71	282	21
12.11.71	281	17
23.12.71	280	11
23.12.71	280	10
23.12.71	280	10

⁺Das Tiermaterial wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Schefels und Herrn Dr. Stolla aus der Abteilung für Andrologie und Künstliche Besamung der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München zur Verfügung gestellt.

3.1.1. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse in 3.1.2. bis 3.1.4. wurde mit einem Rechengerät der Firma Diehl (Combitron S) durchgeführt. Sie orientierte sich nach den von MUDRA (1958) sowie von ADAM und Mitarbeitern (1971) veröffentlichten Grundlagenarbeiten. Die Werte aus der in Tabelle 3a-4b durchgeführten Varianzanalyse wurden mit dem SCHEFFÉ-Test abgesichert. Korrelation bzw. Regression in Abbildung 3 wurden mit dem t-Test bzw. F-Test überprüft.

3.1.2. Genitalgewebe und Inhibitoraktivität

Die Gewebeproben für diese Untersuchungen, Hoden und Samenblasen, lagerten bis zur Aufarbeitung 3-5 Monate bei -20°C . Sie wurden einzeln 1 Std. bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend mit dem doppelten Gewichtsvolumen physiologischer Kochsalzlösung versetzt und unter Kühlung bei 0 bis $+4^{\circ}\text{C}$ homogenisiert. Das Homogenat wurde mit gleicher Volumenmenge 6%iger Perchlorsäure versetzt, um hochmolekulare, säurelabile Proteine zu denaturieren und auszufällen. Der Niederschlag wurde in einer Kühlzentrifuge ($+4^{\circ}\text{C}$) bei 600g abgetrennt und der verbleibende, saure Überstand mit 4 molarer Kaliumkarbonatlösung neutralisiert (pH 7,8). Der klare Extrakt wurde zur Bestimmung der Trypsin-hemmaktivität verwendet und photometrisch nach der Methode von FRITZ und Mitarbeitern (1970) gemessen. Prinzip: Die im Extrakt enthaltenen Inhibitoraktivitäten hemmen die Substratspaltung durch Trypsin. Dabei entspricht 1 Milli-Inhibitoreinheit (1 mIU^+) einer Verminderung der Spaltung des Substrats N-alpha-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid (DL-BAPA)

⁺ Zur Abkürzung fand die international übliche englische Bezeichnung U für Einheit Verwendung.

Tab. 3a: Inhibitoraktivität im Samenblasengewebe (mIU/g Gewebe) von Zwergschweinebern (Substrat: DL-BAPA; Enzym: Trypsin).

Gruppe	n	Samenblasen rechts	n	Samenblasen links	n	$\bar{x}$	Gruppe	$s_{\bar{x}}$
		$\bar{x}$		$\pm s_{\bar{x}}$		$\bar{x}$		$\pm s_{\bar{x}}$
A	5	649,60	176,94	5	689,60	199,07	10	699,70 188,00
B	6	358,00	51,38	6	377,33	87,47	12	367,66 69,42
C	6	156,83	35,82	6	165,50	41,98	12	161,16 38,90

n = Anzahl der untersuchten Organproben

Berechnung der Konfidenzintervalle zwischen Gruppe A, B, C (SCHEFFÉ-Test):

Hypothesen	Gruppen-differenzen	Konfidenz-intervalle	Signifikanz
H_0	A-B: 302,04	384,60	nicht sign. ($P \geq 0,05$)
H_1	A-C: 508,50	465,10	++ ($P \leq 0,01$)
H_2	B-C: 206,50	362,60	nicht sign. ($P \geq 0,05$)

Tab. 3b: Inhibitoraktivität im rechten und linken Hodengewebe (mIU/g) von Zwergschweinebern (Substrat: DL-BAPA; Enzym: Trypsin).

Gruppe	n	Ho.re.	n	Ho.li.	F-Test	Signifikanz
		$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$		$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$		
A	3	16,66 3,17	5	24,60 4,21	1,26	$P \geq 0,05$
B	5	16,60 2,05	6	23,50 3,88		

n = Anzahl der untersuchten Organproben

um 1 Mol pro Minute bzw. der Hemmung von 1 μ g Trypsin.

Es zeigte sich, daß die Inhibitoraktivitäten im Samenblasengewebe von Kontrolltieren (Gruppe A) deutlich größer waren als bei Tieren mit ligiertem Nebenhodenschwanz (Gruppe B) bzw. bei Tieren, die zusätzlich orchitektomiert waren (Gruppe C). Die Differenzen der ermittelten, durchschnittlichen Hemmaktivitäten/Gruppe (Tab. 3a) konnten jedoch nur zwischen Gruppe A und Gruppe C statistisch gesichert werden ($P \leq 0,01$).

Im Hodengewebe dieser Tiere (Gruppen A,B; Tab. 3b) konnten keine unterschiedlichen Inhibitoraktivitäten festgestellt werden ($P \geq 0,05$).

Mit der gleichen Methode wurden die Gewebsproben von Cowperschen Drüsen und Prostata untersucht. Die ermittelten Werte der Hemmaktivitäten (0-10 mIU/g Gewebe) lagen unter der durchschnittlichen Meßfehlergrenze von $\pm 5\%$ und wurden daher in Tabellen 3a, 3b nicht berücksichtigt.

3.1.3. Genitalsekrete und Inhibitoraktivität

Zur Gewinnung der Sekretproben für diese Untersuchungen wurden die Organe, Samenblasen und Nebenhoden, angeschnitten und der Inhalt in Reagenzgläsern aufgefangen. Bis zur Aufarbeitung lagerten die Sekrete unter Zusatz von je 1000 IE Penicillin und 1000 mg Streptomycin 3-5 Monate bei -20°C . Danach wurden sie einzeln aufgetaut und mit dem doppelten Volumen physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung wurde die Inhibitoraktivität aus Samenblasensekret und aus dem Überstand von Nebenhodensekret (nach Zentrifugation bei 600g und $+4^{\circ}\text{C}$) unter Verwendung von DL-BAPA als Substrat gemessen. Das Sediment des Nebenhodensekretes (Spermien) wurde zur Akrosinaktivitätsbestimmung verwendet.

Tab. 4a: Inhibitoraktivität (mIU/ml) in Sekreten aus Samenblasen (Substrat: DL-BAPA; Enzym: Trypsin).

Gruppe		n Samenblasen rechts		n Samenblasen links		$\bar{x}$	Gruppe		$s_{\bar{x}}$
		$\bar{x}$	$\pm s_{\bar{x}}$			$\bar{x}$	$\pm s_{\bar{x}}$		
A	5	2701,00	311,36	5	2651,00	257,45	10	2676,00	284,40
B	6	3035,00	335,81	6	2890,83	382,40	12	2962,91	359,10
C	6	504,00	136,20	6	495,33	141,95	12	499,66	139,07

n = Anzahl der untersuchten Organproben

Berechnung der Konfidenzintervalle zwischen Gruppe A, B, C (SCHEFFÉ-Test):

Hypothesen	Gruppen-differenzen	Konfidenz-intervalle	Signifikanz
H_0	A-B: 286,91	995,88	nicht sign. ($P \geq 0,05$)
H_1	A-C: 2176,34	1204,34	++ ($P \leq 0,01$)
H_2	B-C: 2463,25	1135,46	++ ($P \leq 0,01$)

Tab. 4b: Inhibitoraktivität (mIU/ml) in Sekreten aus
Nebenhodenschwanz (Substrat:DL-BAPA; Enzym:
Trypsin).

Gruppe	n	NS rechts		n	NS links		n	$\bar{x}$ Gruppe	$s_{\bar{x}}$
	$\bar{x}$		$\pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$		$\pm s_{\bar{x}}$			
A	5 $\bar{x}_1$	44,40	6,27	5 $\bar{x}_2$	41,00	7,07	10	42,70	6,67
B	6 $\bar{x}_3$	102,80	22,62	6 $\bar{x}_4$	167,00	30,10	12	134,90	26,36
C	6 $\bar{x}_5$	57,00	6,95	6 $\bar{x}_6$	53,20	8,71	12	55,10	7,83

n = Anzahl der untersuchten Sekretproben

NS= Nebenhodenschwanz

Berechnung der Konfidenzintervalle innerhalb der Gruppen
A, B und C (SCHEFFÉ-Test):

Differenzen	Konfidenzintervalle	Signifikanz	
$\bar{x}_1 - \bar{x}_4$: 122,60	107,28	++	($P \leq 0,01$)
$\bar{x}_2 - \bar{x}_4$: 126,00	107,28	++	($P \leq 0,01$)
$\bar{x}_5 - \bar{x}_4$: 110,00	94,47	+	($P \leq 0,05$)
$\bar{x}_6 - \bar{x}_4$: 113,80	107,28	++	($P \leq 0,01$)

Alle anderen, vergleichbaren Differenzen konnten statistisch nicht gesichert werden ($P \geq 0,05$).

Die durchschnittlichen Inhibitoraktivitäten in den Sekreten aus Samenblasen der Gruppe A (Kontrolle) und Gruppe B (linker NH ligiert) lagen wesentlich ($P \leq 0,01$) über den entsprechenden Werten der Gruppe C (Tab. 4a).

Eine einseitige, doppelte Ligatur des Nebenhodenschwanzes (Tab. 4b; Gruppe B) führt bei nicht orchitektomierten Tieren offensichtlich zu einem Anstieg der nachweisbaren Inhibitoraktivität im Sekret des ligierten Organabschnittes. Die Inhibitoraktivität im unterbundenen, linken Nebenhodenschwanz bei Gruppe B war deutlich höher ($P \leq 0,05$ bzw. $0,01$) als bei nicht ligierten Organen der Gruppe A (Kontrolle) bzw. bei beidseitig ligierten Organen von orchitektomierten Tieren (Gruppe C). Die durchschnittliche Inhibitoraktivität im rechten Nebenhodenschwanz der Gruppe B lag niedriger als im linken, ligierten Organabschnitt. Die Differenzen beider Durchschnittswerte konnten jedoch statistisch nicht gesichert werden ($P \geq 0,05$).

3.1.4. Spermien und Akrosinaktivität

Zusätzlich zu der in 3.1.3. beschriebenen Hemmaktivitätsbestimmung der spermienfreien Nebenhodensekrete wurde bei den Spermien dieser NH-Sekrete und bei Elektroejakulaten der Kontrolltiere (Gruppe A) die Akrosinaktivitätsbestimmung durchgeführt. Das Sperma der Kontrolltiere wurde durch Elektroejakulation (in vivo) gewonnen⁺. Es wurde angestrebt, von jedem Tier 2 ml Samenflüssigkeit

⁺ Die Spermagewinnung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Schefels und Herrn Dr. Stolla aus der Abteilung für Andrologie und Künstliche Besamung der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München durchgeführt.

zu erhalten. War diese Menge erreicht, wurde die Ejakulation abgebrochen.

Zur Akrosinaktivitätsbestimmung wurden die Spermien 5 mal mit physiologischer Kochsalzlösung durch jeweiliges Suspendieren und Zentrifugieren (600g bei $+4^{\circ}\text{C}$) gewaschen und anschließend in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml 2%iger Essigsäure extrahiert. Der essigsaure Extrakt wurde über das kombinierte BAEE/ADH Testsystem nach FINK und Mitarbeitern (1972) bestimmt. Das Prinzip dieses Testsystems basiert auf zwei enzymatischen Umsetzungen: Akrosin spaltet das Substrat BAEE (Benzoyl-L-arginin-äthylester). Das hierbei freigesetzte Äthanol wird mit Hilfe von NAD (Nicotinamid-dinucleotid) und ADH (Alkoholdehydrogenase) bestimmt. Die ermittelten Akrosinaktivitäten wurden auf die Gesamtspermienzahl, die in der Arbeit von SCHEFELS und STOLLA (1975) angegeben sind, bezogen (Abb. 3; Tab. 5a, b). Es zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen Akrosinaktivität und Spermiendichte; dies konnte statistisch gesichert werden ($r = +0,99$; $t = 38,53$; $P \leq 0,01$). Außerdem wurde eine lineare Abhängigkeit festgestellt ($b = +3,20$; $F = 41,54$; $P \leq 0,01$).

Tab. 5a: Absolute Spermienzahl $\times 10^6$ in jeweils 2 ml epididymaler Spermisuspension bzw. 2 ml ejakuliertem Sperma.
Suspensionsmedium: physiologische Kochsalzlösung

Nebenhodenschwanz rechts	Nebenhodenschwanz links	Elektro- ejakulat
Gruppe A: Kontrolltiere		
160	105	249
526	125	79
104	125	219
11	20	927
41	294	66
Gruppe B: Tiere mit doppelter Ligatur des linken Nebenhodenschwanzes		
195	140	
123	140	
104	125	
104	62	
146	62	
89	-	
Gruppe C: Tiere mit beidseitiger Orchitektomie und doppelter Ligatur der beiden Nebenhodenschwänze		
-	66	
-	50	
97	-	
-	231	
273	62	

Die Spermienzahlen stammen aus der Arbeit von SCHEFELS und STOLLA (1975).

- Diese Proben waren nicht verwendbar.

Tab. 5b: Akrosinaktivität (mU/2ml) der essigsäuren Extrakte aus epididymaler Spermiesuspension bzw. ejakuliertem Sperma.

- Suspensionsmedium: physiologische Kochsalzlösung
- biochemisches Testsystem: BAEE (Substrat) unter Verwendung von NAD und ADH

Nebenhodenschwanz rechts	Nebenhodenschwanz links	Elektro- ejakulat
Gruppe A: Kontrolltiere		
5500	3675	8900
16500	4280	2765
3570	4320	7600
380	700	30100
2300	9960	1450
Gruppe B: Tiere mit doppelter Ligatur des linken Nebenhodenschwanzes		
4825	4900	
4280	4960	
3600	4300	
3670	2200	
5100	2160	
3115	-	
Gruppe C: Tiere mit beidseitiger Orchitektomie und doppelter Ligatur der beiden Nebenhodenschwänze		
-	2320	
-	1700	
3420	-	
-	7080	
9500	2170	

- Diese Proben waren nicht verwendbar.

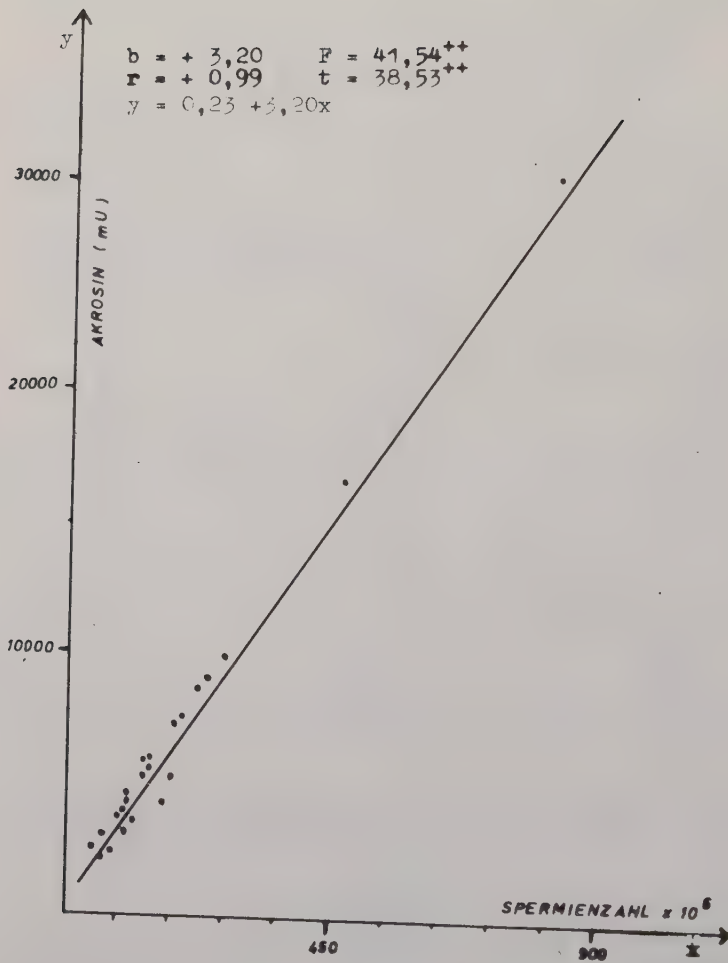


Abb. 3: Korrelation bzw. Regression zwischen y (Akrosinaktivität in mU/2 ml Spermiensuspension) und x (absolute Spermienzahl/2 ml Spermiensuspension).

Korrelationskoeffizient: $r = +0,99$ ($P \leq 0,01$)

Regressionskoeffizient: $b = +3,20$

3.2. Charakterisierung von Inhibitor aus Nebenhoden

3.2.1. Sekretgewinnung

Für den folgenden Versuch stand ein geschlechts-reifer Eber der Rasse Göttinger Zwergschwein zur Verfügung. Nach bedeckter Kastration (unter Nar-kose wie oben) wurden die Nebenhoden (NH) pro-ximal am Übergang zu Hoden und distal am Über-gang zu Duktus deferens abpräpariert und der Samen-leiter eröffnet. Am Nebenhodenkörper wurden 2 Elektroden angeschlossen und mit Hilfe eines Elek-troejakulationsgerätes in der von GROVE und Mit-arbeitern (1968) beschriebenen Art Sekret gewonnen. Die Dichte der Spermien wurde mit Hilfe der Türk'-schen Zählkammer bestimmt (Spermienzahl/mm³).

3.2.2. Hemmaktivitätsbestimmung

Das Nebenhodensekret wurde mit einer definierten Menge physiologischer NaCl-Lösung versetzt und die Suspension 30 Min. bei 600g und +4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Trypsinhemmaktivität ge-testet (Substrat: DL-BAPA; Enzym: Rindertrypsin). 1 ml dieses spermienfreien Nebenhodensekretes enthielt 350 mIU.

3.2.3. Säurestabilität des Inhibitors aus spermienfreiem NH-Sekret

Zur Prüfung der Säurestabilität wurde spermienfrei-es Nebenhodensekret mit 6%iger Perchlorsäure ver-setzt, so daß eine 3%ige Endkonzentration an HClO₄ vorlag (pH ca. 0,5). Danach wurde der saure Ansatz zentrifugiert (600g, +4°C), der Überstand mit 1n KHCO₃ neutralisiert (pH 7,6) und nach erneuter Zentrifuga-

tion auf seine Hemmaktivität überprüft. Unter Berücksichtigung der Verdünnung durch die Reagenzienzugabe wurde im säurebehandelten Extrakt (335 mIU/ml) die annähernd gleiche Hemmaktivität wie im nativen NH-Sekret (350 mIU/ml) gefunden. Der Inhibitor aus NH-Sekret schien säurestabil zu sein.

3.2.4. Fraktionierung von inhibitorhaltigem, spermienfreiem Nebenhodenextrakt.

Das den Trypsininhibitor enthaltende, spermienfreie, epididymale Sekret wurde mit 6%iger HClO_4 im Volumenverhältnis 1:1 versetzt und anschließend auf pH 1,0 eingestellt. Die Lösung blieb 1 Std. bei Raumtemperatur stehen. Beim Zurückstellen des pH-Wertes mit 2 normaler NaOH auf pH 4,0 entstand eine leichte Trübung, die abzentrifugiert wurde. Der klare Überstand wurde nach Konzentrierung in einer Amicon-Zelle (UM-05 Membran, 5 atm) auf eine Sephadex G-75 Säule (100 x 2 cm) aufgetragen. Äquibriert und entwickelt wurde mit 2%iger Essigsäure (pH 2,0) mit einer Geschwindigkeit von 7,5 ml pro Stunde und 2,5 ml pro Fraktion. Jede Fraktion wurde auf Trypsin-hemmaktivität getestet (DL-BAPA).

Es konnte eine inhibitorisch aktive Fraktion mit einem einheitlichen Molekulargewicht eluiert werden (Abb. 4).

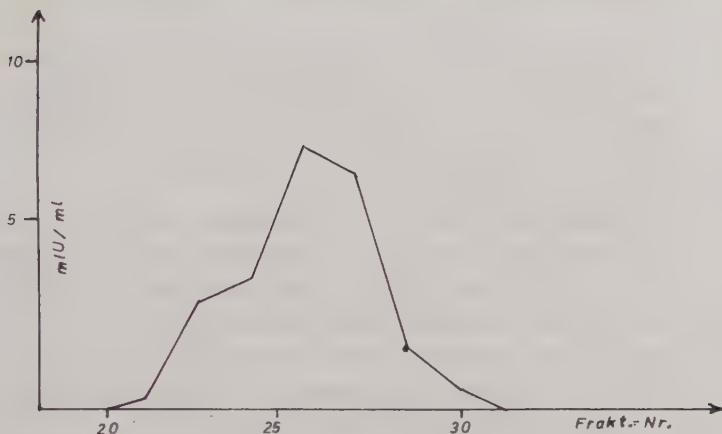


Abb. 4: Fraktionierung von inhibitorhaltigem, spermienfreiem Nebenhodenextrakt an Sephadex G-75 bei pH 2,0.

3.2.5. Assoziation von Inhibitor aus Schweinespermien (SSI) an epididymale Spermien.

Es wurden 100×10^6 epididymale Spermien mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Die Spermien wurden 1 Std. mit 1000 mIU SSI (gelöst in 1 ml physiologischer NaCl-Lösung) bei Raumtemperatur inkubiert. Ausgegangen wurde von der Annahme, daß an epididymale Spermien kein Inhibitor gebunden sei. Bei Assoziation von dem Inhibitor an die Spermien müßte sich deshalb eine Abnahme der Inhibitoraktivität in der Inkubationslösung zeigen.

In der Inkubationslösung wurde jedoch nach Zentrifugation (600g bei $+4^{\circ}\text{C}$) eine Hemmaktivität von 1050 mIU gemessen, d.h., es wurde offensichtlich kein Inhibitor an epididymale Spermien gebunden. Dabei ist aber zu beachten, daß zur Zeit noch nicht bekannt ist, wieviel Inhibitor von Spermien gebunden werden kann.

3.2.6. Fraktionierung von essigsaurem NH-Spermienextrakt

Epididymale Spermien wurden mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, anschließend mit 2%iger Essigsäure (pH 2,0) extrahiert und der essigsaure Extrakt an Sephadex G-75 fraktioniert (Bedingungen siehe 3.2.4.).

Die Fraktionen wurden auf Akrosin- und auf Inhibitoraktivität untersucht (Substrate: BAEE, DL-BAPA). Es konnte erstmals Trypsinhemmaktivität in epididymalem, essigsaurem Spermienextrakt gefunden werden. Die graphische Darstellung läßt bei der inhibitorisch aktiven Komponente eine Auftrennung in 2 Unterfraktionen erkennen (Abb. 5).

Es wurde also sowohl in spermienfreiem, epididymalem Sekret als auch in NH-Spermienextrakt ein säurestabiler Inhibitor gefunden und durch Fraktionierung über Sephadex G-75 gereinigt.

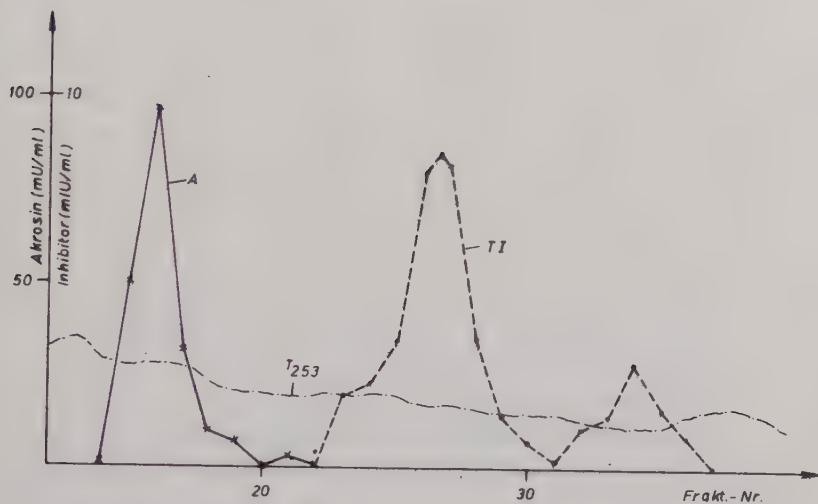


Abb. 5: Fraktionierung von essigsauerm epididymalem Spermienextrakt an Sephadex G-75 bei pH 2,0.

T_{253} = Transmission bei 253 nm

A = Akrosinaktivität

TI = Trypsin inhibierende Aktivität

3.3. Freisetzung von Inhibitor aus dem Akrosin-Inhibitor-Komplex in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Inkubationszeit.

Um den Inhibitor, der im spermienfreien Überstand (Plasma) möglicherweise noch in einem Akrosin-Inhibitor-Komplex vorliegt, vollständig zu dissoziieren, wurde das Plasma aus drei Ejakulaten in jeweils mehreren Proben unterschiedlich stark angesäuert. Dazu wurden frische Ejakulate 15 Minuten bei 600g und $+4^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert und der Überstand (Plasma) jeweils auf seine Hemmaktivität gemessen (DL-BAPA). Die Ansäuerung erfolgte mit HCl bzw. HClO_4 . Bei allen Versuchen wurde als Kontrolle das Plasma bei seinem natürlichen pH-Wert belassen, einmal unterblieb aus arbeitstechnischen Gründen die Kontrollmessung. Die Ansatzlösungen mit jeweils gleicher Hemmaktivität (0 Stunden) wurden bei Raumtemperatur inkubiert und nach 2 Std., 6 Std., 22 Std. und einmal nach 29 Std. gemessen.

Es zeigte sich bei allen Ansätzen, die mit HCl angesäuert wurden, im Laufe der Inkubationszeit ein Anstieg der Inhibitoraktivität, der jedoch teilweise nur vorübergehend war (Tab.6; Abb.6; Tab.7, pH 1,0 und 2,0; Tab. 8, pH 2,0). Wurden die Proben mit HClO_4 angesäuert, blieb die Hemmaktivität gleich (Tab. 7, pH 0,5) oder fiel unter den Ausgangswert ab (Tab. 8, pH 0,5, pH 1,0). Bei der Kontrolle wurde ein leichter Anstieg (Tab. 7), aber auch ein Verlust an Hemmaktivität (Tab. 8) festgestellt.

Tab. 6: Freisetzung von Inhibitor (IU/ml) aus dem Akro-
sin-Inhibitor-Komplex im Seminalplasma in Ab-
hängigkeit vom pH-Wert und der Inkubationszeit
(Ansäuerung mit HCl, ohne Kontrolle).

pH	0 Std.	2 Std.	6 Std.	22 Std.	29 Std.
0,4	1,5	1,3	1,5	1,8	1,9
1,0	1,5	1,8	1,9	2,0	1,9
1,5	1,5	1,7	1,8	1,9	2,0
2,0	1,5	1,5	1,7	1,8	1,9

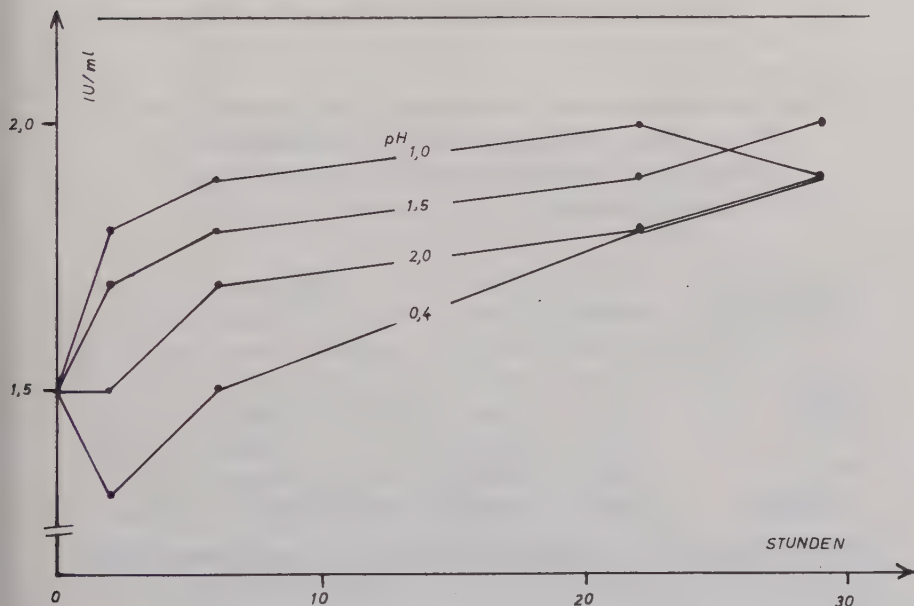


Abb. 6: Freisetzung von Inhibitor (IU/ml) aus dem Akro-
sin-Inhibitor-Komplex im Seminalplasma in Ab-
hängigkeit vom pH-Wert und der Inkubationszeit
(Ansäuerung mit HCl, ohne Kontrolle).

Tab. 7: Freisetzung von Inhibitor (IU/ml) aus dem Akro-sin-Inhibitor-Komplex im Seminalplasma in Ab-hängigkeit vom pH-Wert und der Inkubationszeit (Kontrolle=pH 7,8).

Ansäuerung mit	pH	0 Std.	2 Std.	6 Std.	22 Std.
HClO ₄	0,5	11,8	11,0	11,4	11,0
HCl	1,0	11,8	12,9	18,7	14,1
HCl	2,0	11,8	13,8	19,5	13,9
Kontrolle	7,8	11,8	12,0	12,1	13,2

Tab. 8: Freisetzung von Inhibitor (IU/ml) aus dem Akro-sin-Inhibitor-Komplex im Seminalplasma in Ab-hängigkeit vom pH-Wert und der Inkubationszeit (Kontrolle=pH 8,4).

Ansäuerung mit	pH	0 Std.	2 Std.	6 Std.	22 Std.
HClO ₄	0,5	12,7	6,3	6,3	3,7
HClO ₄	1,0	12,7	9,5	10,3	9,9
HCl	2,0	12,7	10,6	18,3	20,1
Kontrolle	8,4	12,7	9,3	9,3	8,4

3.4. Fraktionierung und Reinigung von Inhibitor aus frischem und 24 Std. altem bzw. 2 Tage bei -40°C gelagertem Schweinespermaplasma aus verschiedenen Ejakulaten an Sephadex G-75 bei pH 7,6

3.4.1. Methodik

Die Trennung der seminalen Plasmaproteine erfolgte durch die Gelfiltration an Sephadex G-75. Jeweils 3 ml Seminalplasma wurden auf die Säule aufgetragen.

Die Säule hatte 120 cm Länge und 1,8 cm Durchmesser und wurde mit Sephadex G-75 Gel gefüllt. Der angegebene Fraktionierungsbereich liegt hier für Peptide und globuläre Proteine zwischen 3000 und 70000 MG (DETERMANN, 1967). Die Äquilibrierung und Eluierung erfolgte mit einem 0,2 M TRA-Puffer*, der auf pH 7,6 eingestellt und mit NaCl (0,5 M) versetzt war. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 20 ml/Std. (5 Fraktionen). Die Hemmaktivität jeder Fraktion wurde an Akrosin und Trypsin (Abb. 7, 9, 10) oder nur an Trypsin gemessen (Tab. 8, 11). Der hochmolekulare Inhibitor (I) wurde einmal aus technischen Gründen nicht gemessen (Abb. 9). Die Transmission des Eluats wurde bei $T=253$ gemessen und von einem Uvicord aufgezeichnet.

T_{253} = Transmission bei 253 nm

TRA = Triäthanolamin-HCl

3.4.2. Fraktionierung von frischem Seminalplasma

Die Spermien des frisch gewonnenen Ejakulats eines Zwergschweinebers wurden durch Zentrifugation (600g bei $+4^{\circ}\text{C}$) vom Seminalplasma getrennt und 3 ml des klaren Überstandes (Plasma; ca. 4800 mIU) auf die Säule

aufgetragen. Das Plasma konnte in 3 inhibitorisch aktive Fraktionen (I, IIa, IIb) aufgetrennt werden, wobei das Molekulargewicht der Fraktion I bei ca. 45000, das von IIa und IIb bei ca. 12500 bzw. 6500 lag. Anhand der Transmissionskurve (T_{253}) ist ein deutlicher Reinigungsschritt des Plasmas zu erkennen (Abb. 7). Zu den beiden Fraktionsgipfeln von IIa und IIb wurden Hemmkurven angefertigt. Die Hemmung verlief im linearen Bereich (Abb. 8).

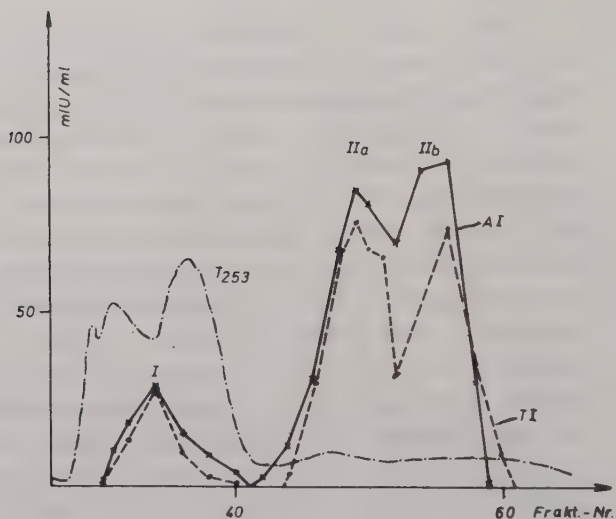


Abb. 7: Fraktionierung von Eberseminplasma an Sephadex G-75, 2 Std. nach Ejakulation aufgetragen.

T_{253} = Transmission bei 253 nm

TI = Trypsin inhibierende Aktivität

AI = Akrosin inhibierende Aktivität

I = Fraktion 1

II = Fraktion 2 mit den Gipfeln a und b

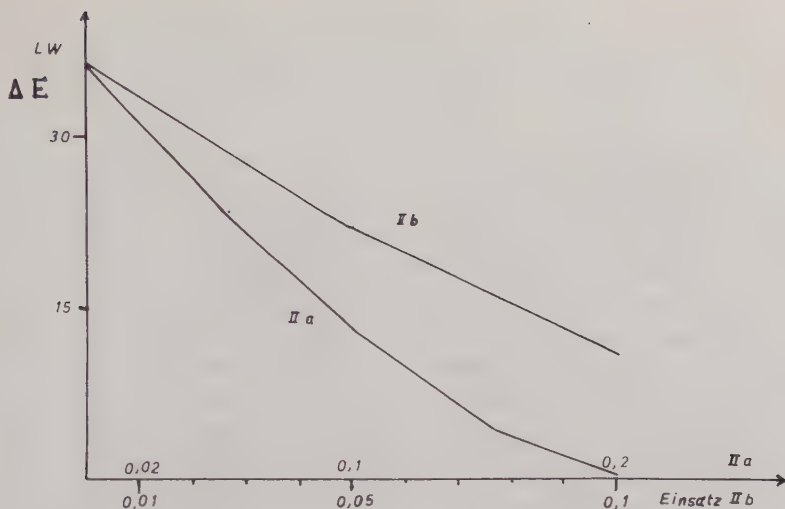


Abb. 8: Abhängigkeit der Hemmung des Trypsin von der Inhibitorkonzentration (Hemmkurven).
Ordinate: Restaktivität der eingesetzten konstanten Menge (LW) an Trypsin nach Zugabe unterschiedlicher Mengen von Inhibitor (s. Abszisse);
Abszisse: Zugegebene Menge an Eluat (Inhibitor) der Fraktion IIa und IIb (ml);
LW: Leerwert (beim Ansatz verwendete Menge an Enzym)
Ansatzvolumen: 3 ml

3.4.3. Fraktionierung von Spermaplasma nach 24 stündiger Lagerung bei Raumtemperatur

Um den Einfluß der Alterung auf den Inhibitor aus Eberspermaplasma zu untersuchen, wurde Spermaplasma 24 Std. bei Raumtemperatur gelagert und anschließend an Sephadex G-75 fraktioniert.

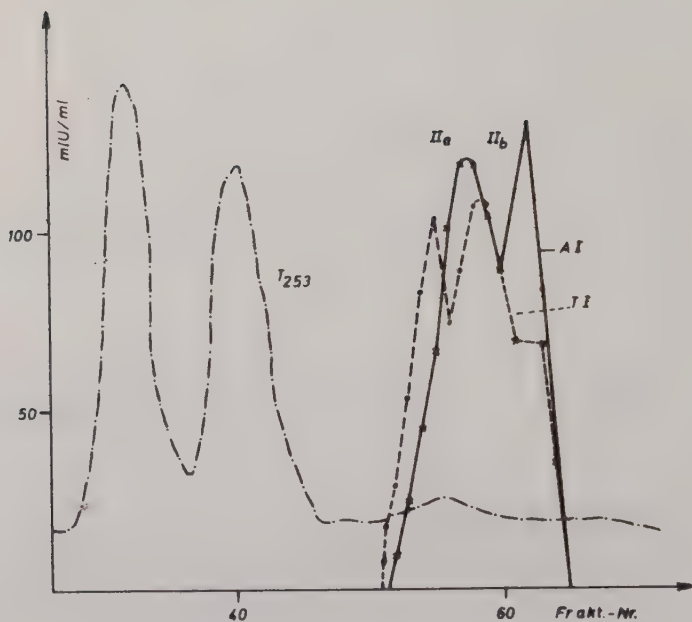


Abb. 9: Fraktionierung von Eberspermaplasma an Sephadex G-75 (pH 7,8) nach 24 stündiger Lagerung bei Raumtemperatur. Der Serum-inhibitor wurde nicht berücksichtigt.

T_{253} = Transmission bei 253 nm

TI = Trypsin inhibierende Aktivität

AI = Akrosin inhibierende Aktivität

Es zeigte sich bei der Auftrennung von IIa und IIb kein Unterschied gegenüber der Fraktionierung von frischem Plasma (Abb. 7).

- 3.4.4. Fraktionierung von Spermaplasma - zu einem Teil
2 Tage bei -40°C eingefroren - zum anderen Teil
24 Stunden mit Säure behandelt

Ebersperma wurde nach Ejakulation zentrifugiert (600g bei $+4^{\circ}\text{C}$) und der Überstand in 2 gleiche Proben aufgeteilt. Davon wurde ein Teil bei -40°C eingefroren, der andere mit 6%iger HClO_4 im Verhältnis 1:1 versetzt und auf pH 1,0 eingestellt. Der saure Ansatz wurde nach 24 stündiger Lagerung (bei Raumtemperatur) mit K_2CO_3 neutralisiert, das ausgefallene KClO_4 abzentrifugiert und der klare Überstand auf die Sephadex G-75 Säule aufgetragen. Weitere 24 Stunden später wurde die tiefgefrorene Probe nach Auftauen ebenfalls über Sephadex G-75 fraktioniert.

Beim Vergleich der verschiedenen Ansätze stellte sich heraus, daß die Hemmaktivitäten der 3 Fraktionen durch Ansäuerung zurückgingen, vor allem aber die hochmolekulare Inhibitorfraktion I (Abb. 10; Abb. 11: I). Die zweite inhibitorisch aktive Fraktion läßt bei Gipfel IIa nochmals eine Auftrennung in 2 Unterfraktionen erkennen (Abb. 10).

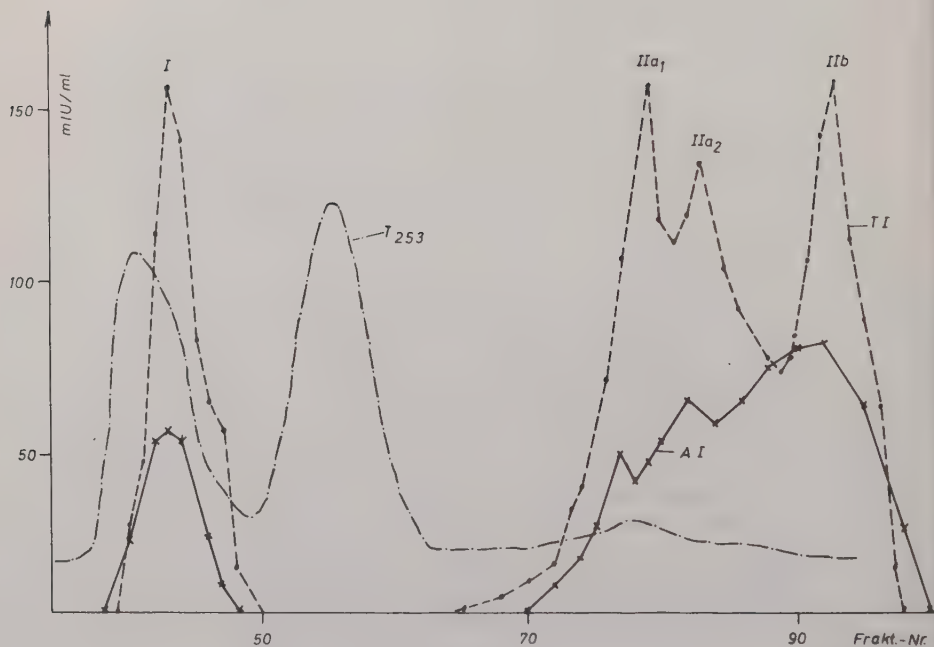


Abb. 10: Fraktionierung von Eber-Seminalplasma an Sephadex G-75, pH 7,6 nach 2 tägiger Lagerung bei -40°C .

T_{253} = Transmission bei 253 nm

TI = Trypsin inhibierende Aktivität

AI = Akrosin inhibierende Aktivität

I = Fraktion 1

II = Fraktion 2 mit den Gipfeln a_1 , a_2 und b

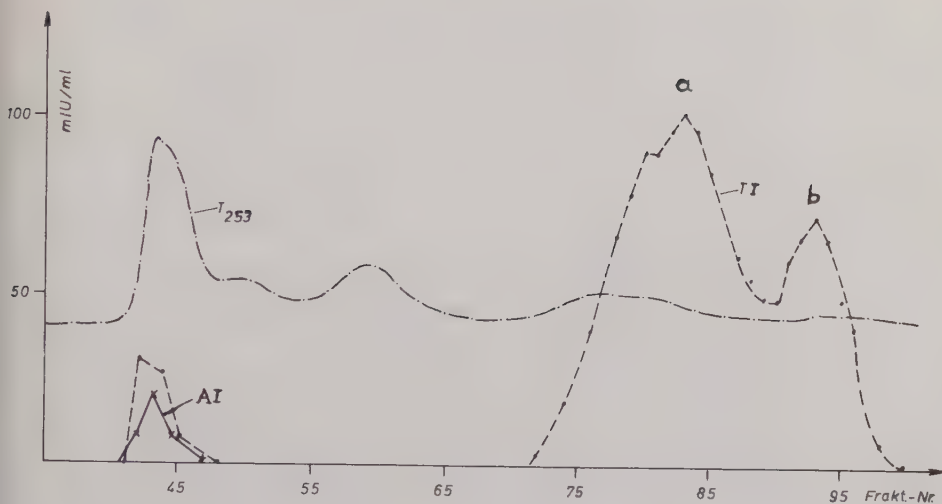


Abb. 11: Fraktionierung von säurebehandeltem
(pH 1,0) Eber-Seminalplasma an Sephadex
G-75. Getestet wurde nur gegen Trypsin.
T₂₅₃ = Transmission bei 253 nm
TI = Trypsin inhibierende Aktivität
AI = Akrosin inhibierende Aktivität
I = Fraktion 1
II = Fraktion 2 mit den Gipfeln a und b

3.5. Inhibitoraktivität und Fraktionierung von Plasma der Vorphase, der ersten und zweiten Hauptphase eines Eberejakulats

Das Sperma wurde während der Ejakulation am Phantom in die Vorphase, in die erste und die zweite Hauptphase aufgeteilt. Diese Aufteilung erfolgte nach der Farbintensität des Ejakulats. Das gallertartige Sekret der Glandulae Bulbourethrales (Cowpersche Drüse) wurde bereits während der Spermagewinnung mit Gaze abfiltriert. Das Plasma der drei Proben wurde getrennt auf Trypsinhemmaktivität untersucht.

Es ergaben sich für das Sekret der Vorphase 6920 mIU/ml, für die Sekrete der ersten und zweiten Hauptphase 2780 mIU/ml bzw. 2410 mIU/ml.

Zur Fraktionierung an Sephadex G-75 sind die Bedingungen in 3.4.1. angegeben. Fraktion I aus Sekret der 1. Hauptphase wurde nicht berücksichtigt (Abb. 13). Die Hemmaktivitäten wurden an Trypsin gemessen, beim Sekret der Vorphase auch an Akrosin (Abb. 12).

Es zeigte sich bei den Sekreten aller Phasen eine Auftrennung der inhibitorisch aktiven Komponenten IIa und IIb, die in Abb. 12 (Vorphase) besonders deutlich, im Sekret der ersten und zweiten Hauptphase schwach bzw. nur als Schulter dargestellt wurde (Abb. 13, 14).

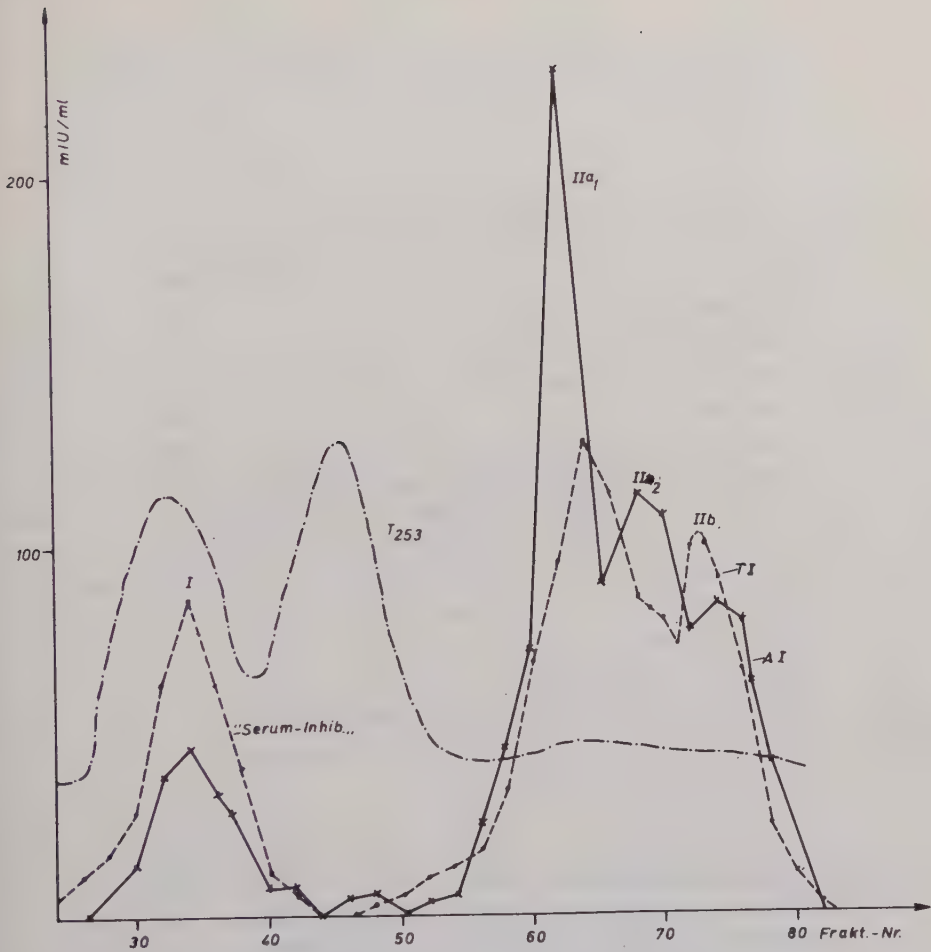


Abb. 12: Fraktionierung des Sekretes der Vorphase an Sephadex G-75.

T₂₅₃ = Transmission bei 253 nm

TI = Trypsin inhibierende Aktivität

AI = Akrosin inhibierende Aktivität

I = Fraktion 1

II = Fraktion 2 mit den Gipfeln a₁, a₂ und b

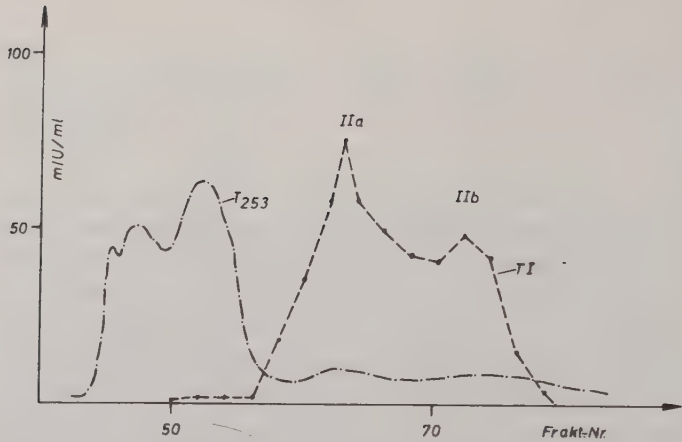


Abb. 13: Graphische Darstellung der Inhibitorauf-
trennung aus der 1. Hauptphase durch
Fraktionierung an Sephadex G-75.
T₂₅₃ = Transmission bei 253 nm
TI = Trypsin inhibierende Aktivität
II = Fraktion 2 mit den Gipfeln a und b

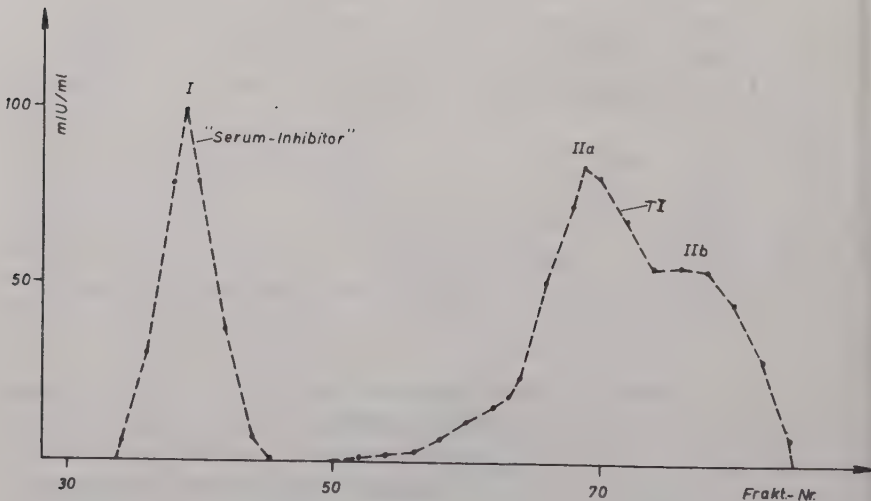


Abb. 14: Fraktionierung der 2. Hauptphase an Se-
phadex G-75. Der Inhibitor wurde nur ge-
gen Trypsin getestet.
TI = Trypsin inhibierende Aktivität
II = Fraktion 2 mit den Gipfeln a und b

3.6. Anreicherung der Inhibitoren aus Seminalplasma und Rechromatographie der isolierten Unterfraktionen

3.6.1. Methodik

Die Anreicherung der Inhibitoren erfolgte mittels Gelfiltration an Sephadex G-75. Länge und Durchmesser der Säule, die mit H_2O gekühlt wurde, waren $130 \times 6,5$ cm. Äquibriert und eluiert wurde mit einem Puffer vom pH 7,6, der sich zusammensetzte aus 0,1 M TRA, 0,5 M NaCl und 0,02%igem NaN_3 (Na-acid). Na-acid wurde wegen seiner bakteriziden Wirkung zur besseren Haltbarkeit des Säulenmaterials zugesetzt. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 120 ml/Std. (12 Fraktionen/h). Zur Rechromatographie wurden die isolierten Fraktionen IIa und IIb durch Ultrafiltration (Amicon, Membran UM-05) entsalzt und anschließend lyophilisiert. Länge und Durchmesser der Säule waren hier $140 \times 1,8$ cm. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 3 Fraktionen à 2,5 ml/Std. Die übrigen Bedingungen waren wie oben.

3.6.2. Quantitative Anreicherung

Zur Verfügung stand tiefgefrorenes und frisch ejakuliertes Eberspermaplasma. Die Ejakulate wurden stets sofort nach der Gewinnung bei 600 g und $+4^{\circ}C$ 90 Min. zentrifugiert und der Überstand weiterverarbeitet bzw. zunächst eingefroren. Der hochmolekulare "Seruminhibitor" fand nur teilweise und die schwach aktiven Zwischenfraktionen keine Berücksichtigung (Tab. 9).

Tab.: 9: Übersicht der Isolierung von Inhibitor aus Seminalplasma.

Sperma- plasma	Inhibitoraktivität IU		Ausbeute	
ml	aufgetragen	eluiert		%
nach Lage- rung bei -40°C		IIa	IIb	
100	100	34,4	32,4	66,8
73	73	28,4	23,5	71,0
95	205	71,0	52,3	60,5
80	72	26,2	20,9	65,5
sofortige Auf- arbeitung bei Zimmertemperatur				
56	180	112,0	20,5	74,0
82	185	65,0	57,0	67,0
98	162	59,0	50,8	68,0
100	429	179,6	85,0	61,0
+ 93	208	55,1	53,4	80,0
+ 90	256	67,1	65,7	78,5

+ Hier wurde auch der Serum-inhibitor berücksichtigt.

3.6.3. Rechromatographie der Inhibitorfraktionen IIa und IIb

3.6.3.1. Fraktion IIa

130 mg der Inhibitorfraktion IIa wurden in 5 ml Puffer gelöst und auf die Säule aufgetragen. 130 mg entsprechen 54 IU (Inhibitor Units). Eluiert wurden 44,2 IU, das entspricht einer Ausbeute von 82%.

Wie aus dem Elutionsdiagramm hervorgeht, wurde Inhibitorfraktion IIa bei der Rechromatographie

in 2 Unterfraktionen (IIa_1 , IIa_2) getrennt (Abb. 15). Nach mehrfacher Abtestung wurden die Inhibitor-komponenten IIa_1 und IIa_2 gesammelt. Nach erneuter Rechromatographie waren diese Unterfraktionen einheitlich.

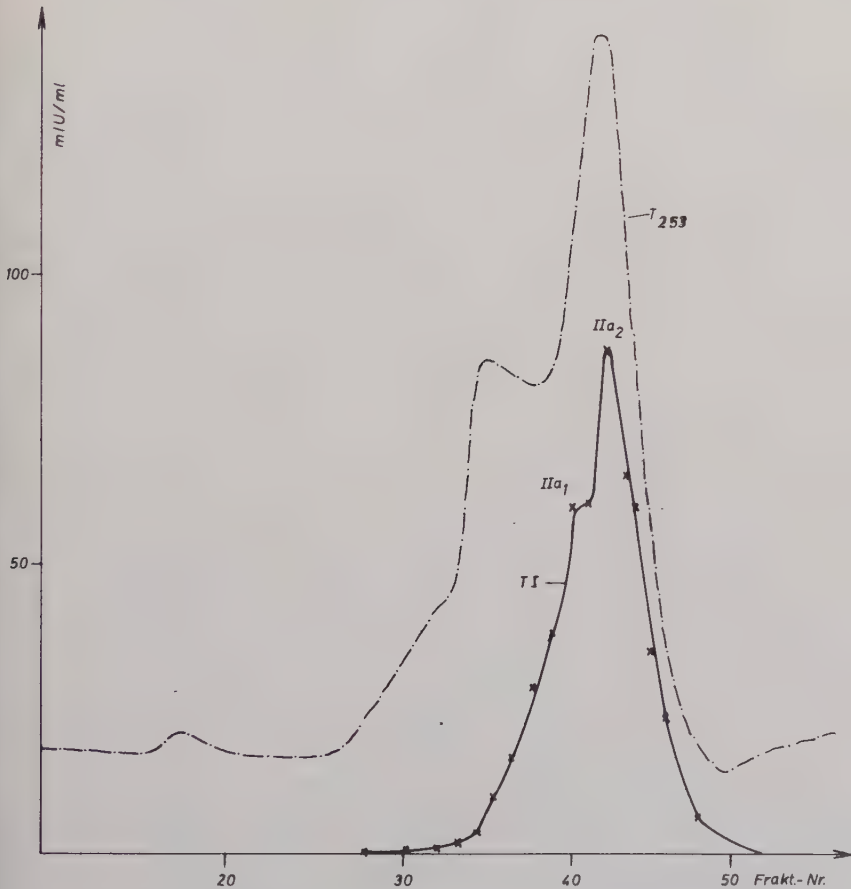


Abb. 15: Rechromatographie der Inhibitorfraktion IIa .
 T_{253} = Transmission bei 253 nm
 TI = Trypsin inhibierende Aktivität
 II = Fraktion 2 mit den Gipfeln a_1 und a_2

3.6.3.2. Fraktion IIb

Fraktion IIb wurde analog zu Fraktion IIa rechromatographiert.

Die Inhibitorfraktion IIb konnte einheitlich eluiert werden (Abb. 16).

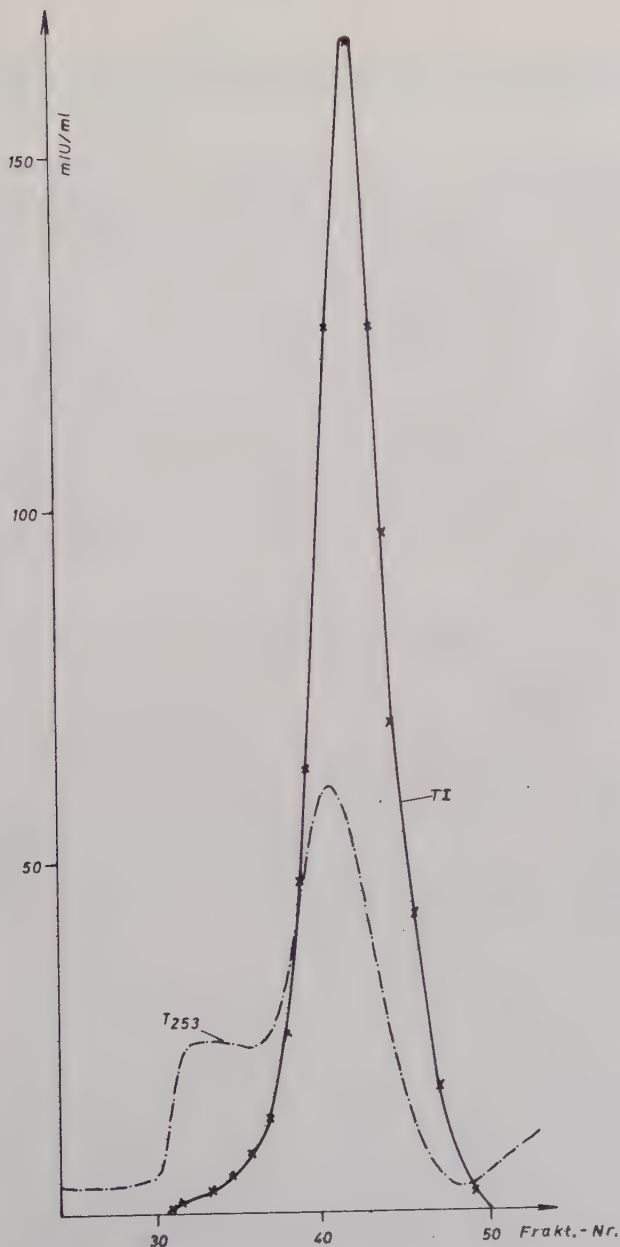


Abb. 16: Rechromatographie der Inhibitorfraktion IIb

T₂₅₃ = Transmission bei 253 nm

TI = Trypsin inhibierende Aktivität

3.7. Vergleich der Hemmspektren der Inhibitoren aus Seminalplasma und Spermien

Verglichen wurde das Hemmverhalten der verschiedenen Inhibitorfraktionen aus Ebersperma, wobei die "Inhibitoren" II, IIa und IIb aus dem vorher beschriebenen Versuch verwendet wurden. Der Spermieninhibitor (SSI) wurde aus einem essigsaurigen Spermienextrakt über Sephadex G-75 isoliert und nach Entsalzen lyophilisiert. Anschließend wurden 20 mg dieses SSI in 1 ml 0,0025 normaler HCl gelöst und mit 2 ml Puffer auf pH 7,6 zurückgestellt. Dabei kam es zu einem trüben Niederschlag. Nach Zentrifugation (600g bei +4°C) wurde der klare Überstand einheitlich rechromatographiert (Bedingungen wie in 3.6.1.).

Es wurde das Hemmverhalten gegen Plasmin, Trypsin, Akrosin und Chymotrypsin sowie gegen Kallikrein untersucht. Die Hemmung wurde auf mg Inhibitoreinsatz bezogen.

Es stellte sich heraus, daß alle eingesetzten Inhibitorfraktionen Plasmin, Trypsin und Akrosin hemmten. Die Aktivität von Chymotrypsin und Kallikrein konnte von keiner Inhibitorfraktion gehemmt werden (Tab. 10). Die Hemmung von Akrosin war stets stärker als die von Trypsin, die von Trypsin stärker als die von Plasmin.

Tab. 10: Hemmspektrum der Inhibitoren aus Ebersperma.

Inhibitor	Enzym		
	Plasmin mIU/	Trypsin mg Inhibitor	Akrosin
SSI	30	920	2200
Fraktion I	27	730	1400
Fraktion IIa	55	1100	3400
Fraktion IIb	120	2300	8600

4. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, einen Beitrag zur Charakterisierung und Verteilung von Proteinase-Inhibitoren in Genitalorganen und deren Sekreten von männlichen Schweinen zu leisten, wobei ihre Hemmwirkung auf Akrosin und Trypsin besonders berücksichtigt wurde. Darüberhinaus sollte der Einfluß der Orchitektomie auf die Inhibitorkonzentration in den Geweben und Sekreten des Genitale untersucht werden.

HAENDLE (1965) und andere Autoren (WERLE und Mitarbeiter, 1968) beschrieben, daß die Synthese der Inhibitoren aus Genitalsekreten hormongesteuert ist. 30 Tage nach Kastration fanden sie einen deutlichen Abfall der Inhibitorkonzentrationen in Samenblasensekreten von Mäusen, die durch substituierende Testosterongaben auf ein deutlich (ca. 20mal) über den Ausgangswerten liegendes Maximum vergrößert werden konnten. Auch bei eigenen Untersuchungen zeigte sich nach Orchitektomie - und somit Änderung des hormonellen Status - ein Abfall der Inhibitor-konzentration sowohl im Gewebe als auch im Sekret von Samenblasen ($P \leq 0,01$). Durch diese Ergebnisse wird die Hormonabhängigkeit der Inhibitorproduktion in Samenblasensekret bzw. Gewebe auch beim Eber wahrscheinlich.

Die Ligatur des Nebenhodenschwanzes (NHS) bei den nicht orchitektomierten Versuchstieren der Gruppe B führte zu einer deutlichen Erhöhung der Inhibitoraktivität in den Sekreten des ligierten Organabschnitts (Tab. 4b). Die nachweisbare Hemmaktivität im ebenfalls ligierten NHS orchitektomierter

Eber (Gruppe C) unterschied sich jedoch nicht von dem bei der Gruppe A ermittelten Kontrollwert. Die Erhöhung der Hemmaktivität im ligierten NHS nicht orchitektomierter Tiere legt den Schluß nahe, daß der kanalikuläre Abfluß eines eventuell im NHS-Gewebe produzierten und sezernierten Proteinase-Inhibitors verhindert wurde. Zudem unterliegt die Inhibitorproduktion im NHS wahrscheinlich - ähnlich wie in Samenblasen (HAENDLE, 1969; WERLE und Mitarbeiter, 1968) - einer hormonellen Steuerung, da bei orchitektomierten Tieren (Gruppe C) der nach NHS-Ligation zu erwartende Anstieg ausblieb.

Der Vergleich der Gewebs- und Sekretextrakte aus einzelnen Abschnitten des Genitale deutet an, daß der Hauptanteil des Inhibitors in den Samenblasen zu finden ist. Die Konzentration des Inhibitors im Hoden und Nebenhoden ist wesentlich niedriger (etwa 100fach). In Prostata und Cowperschen Drüsen wurden entweder keine oder sehr niedrige Hemmaktivitäten gemessen (0-10 mIU/g).

Neben der Hemmaktivitätsbestimmung in spermienfreien NH-Sekreten wurde aus epididymalen und ejakulierten Spermien Akrosin extrahiert, mit dem kombinierten BAEE/ADH TESTSYSTEM gemessen und die ermittelten Werte mit der ursprünglichen Gesamtzahl der Spermien in 2 ml Sekret verglichen. Dabei zeigte sich eine deutliche Korrelation ($r=+0,99$) zwischen der Akrosinaktivität und Spermindichte.

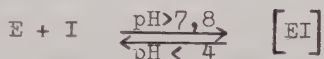
ZANEVELD und Mitarbeiter (1970) beschrieben einen Proteinase-Inhibitor, der in epididymalem Sekret in relativ geringer Konzentration vorkommt. In der

vorliegenden Arbeit gelang es, aus epididymalem, spermienfreiem Sekret Akrosininhistor anzureichern. Die Inhibitoraktivität blieb nach Behandlung mit Perchlorsäure unverändert. Dabei erschien der Inhibitor nach saurer Extraktion (pH 1,0) bzw. Eluierung als einheitliche, inhibitorisch aktive Fraktion.

Ein Inhibitor aus epididymalem Spermienextrakt wurde bisher nicht beschrieben und man ging daher von der Annahme aus, daß an epididymale Spermien kein Inhibitor gebunden wird. Um dies zu überprüfen, wurden epididymale Spermien in einer Lösung mit neutralem pH-Wert inkubiert, die eine definierte Menge gereinigten Inhibitors (SSI) aus ejakulierten Spermien enthielt. Da die eingesetzte Inhibitoraktivität auch nach längerer Inkubation mit den NH-Spermien unverändert blieb, ist anzunehmen, daß eine Assoziation von SSI an die Spermien nicht stattgefunden hat.

Interessanterweise konnte bei weiteren Untersuchungen auch aus epididymalem Spermienextrakt erstmals ein Inhibitor isoliert werden, der durch Gelchromatographie, ähnlich wie bei Proteinasehemmern im Seminalplasma, in 2 Inhibitorfraktionen mit unterschiedlichem Molekulargewicht aufgetrennt wurde.. Eventuell wurde durch die Gegenwart dieses Inhibitors auf der äußeren Kopfkapfenmembran epididymaler Spermien die zusätzliche Assoziation von SSI aus ejakulierten Samenzellen verhindert oder beide Inhibitoren sind an innerakrosomale Strukturen gebunden, was eine Bindung an äußere Akrosomenhüllen unwahrscheinlich macht.

In mehreren Vorversuchen fiel auf, daß in Eberseminalplasma (pH 7,8) sowohl freier Inhibitor als auch an Inhibitor gebundenes Akrosin nachgewiesen werden konnte. Es ist anzunehmen, daß Akrosin und Inhibitor dabei als Komplex vorliegen, der unter bestimmten Bedingungen (saurer pH-Wert, Substratüberschuß) spontan dissoziiert (FINK und Mitarbeiter, 1972).



E = Enzym (Akrosin)

I = Inhibitor

EI = Akrosin-Inhibitor-Komplex

Um auch diesen gebundenen Inhibitor zu erfassen, wurde Seminalplasma zur Säuredenaturierung des Akrosins verschieden stark angesäuert und die Freisetzung des Inhibitors aus dem Komplex in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Da der Akrosin-Inhibitor-Komplex im sauren Bereich spontan dissoziiert, ist der Anstieg der Inhibitoraktivität im angesäuerten Seminalplasma nach 29 Std. (Tab. 6, Abb. 6) vermutlich auf eine Akrosindenaturierung bei relativ säurestabilen Inhibitoren zurückzuführen. Der Zusatz einer stark denaturierenden Säure ($HClO_4$) zum Seminalplasma führt jedoch offensichtlich auch zu einer Zerstörung des Inhibitors, was durch einen Abfall der Hemmaktivität bereits nach 2 Std. deutlich wird (Tab. 7, 8). Eventuell ist die unterschiedliche Zunahme bzw. der Abfall der Inhibitoraktivitäten auf verschiedene Proteinkomponenten pro Ejakulat zurückzuführen, wobei vermutlich der Anteil des säurelabilen "Seruminhibitors" (SCHILL und WOLF, unveröffentlicht) eine wesentliche Rolle spielt.

Bei der Anreicherung von Inhibitor aus Eberseminalplasma wurden im wesentlichen zwei Inhibitor-komponenten (IIa, IIb) gefunden (Abb. 7-14), wobei sich die Fraktion IIa in 2 Unterfraktionen (IIa₁, IIa₂) auftrennen ließ. Die Hemmaktivität gegenüber Trypsin lag bei Fraktion IIa ausnahmslos über den entsprechenden Werten bei Fraktion IIb. Ihr Molekulargewicht wurde durch Gelfiltration ermittelt, wobei zur Eichung der Säule Proteine mit bekannten Molekülgrößen verwendet wurden. Das Molekulargewicht von Inhibitorfraktion IIa liegt bei ca. 12500 und das von Fraktion IIb bei ca. 6500. Neben diesen beiden Komponenten wurde aus dem Seminalplasma ein hochmolekularer Inhibitor (MG=45000) abgetrennt (Abb. 7,10,11, 12,14), der, deutlicher als Fraktion IIb, nach Säurebehandlung (HClO₄; pH 1,0) einen Aktivitätsverlust zeigt. Es wird vermutet, daß es sich um einen Inhibitor handelt, der aus dem Serum stammt; beim Menschen ist inzwischen bekannt, daß im Blut vorhandene Proteinase-Inhibitoren in das Genitalgewebe diffundieren und in beträchtlicher Menge mit dem Sperma ausgeschieden werden (SCHILL und WOLF, unveröffentlicht).

Durch Alterung, Einfrieren und Auftauen des Plasmas (Abb. 7,9,10) ist in den vorliegenden Untersuchungen kein wesentlicher Unterschied hinsichtlich des Hemmverhaltens zu frischem Plasma feststellbar.

Nach Auftrennung der inhibitorisch aktiven Komponenten aus Seminalplasma der Vorphase, der ersten und zweiten Hauptphase eines Ejakulats zeigten

sich quantitative Unterschiede in der Hemmaktivität, was wahrscheinlich auf ein unterschiedliches Spermien-Plasma Verhältnis in den 3 Phasen zurückzuführen ist. Im Hemmverhalten wurden jedoch keine Differenzen festgestellt.

Bei Untersuchung des Hemmspektrums der Inhibitoren aus Seminalplasma und Spermien (Fraktion I, IIa, IIb bzw. SSI) wurde eine gemeinsame inhibitorische Aktivität gegen Plasmin, Trypsin und Akroisin gefunden, wobei die quantitativen Abweichungen im Hemmverhalten auf die unterschiedliche Substratspezifität der eingesetzten Proteinasen zurückzuführen ist (SCHIESSLER, 1972).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde versucht, einen Beitrag zur Charakterisierung und Verteilung von Proteinase-Inhibitoren in Genitalorganen und -sekreten männlicher Schweine zu leisten, wobei ihre Hemmwirkung auf Akrosin und Trypsin besonders berücksichtigt wurde. Darüberhinaus sollte der Einfluß der Orchitektomie auf die Inhibitorkonzentration in den Geweben und Sekreten des Genitale untersucht werden.

Der Proteinase-Inhibitor wurde aus verschiedenen Abschnitten des Genitaltrakts von 18 Zwergschweinebern quantitativ ermittelt. Dabei ergab sich, daß der Hauptanteil (ca. 2700 mIU/ml) in den Samenblasen zu finden war. In Nebenhoden und Hoden war die Konzentration ca. 100mal niedriger. Der Inhibitorgehalt in Prostata und Cowperschen Drüsen lag bei 0-10 mIU/g Gewebe.

Nach Orchitektomie wurde ein deutlicher Abfall der Inhibitoraktivität in Samenblasenflüssigkeit von 2676 mIU/ml ($\bar{x}$) auf 499 mIU/ml ($\bar{x}$) beobachtet ($P \leq 0,01$). Die Produktion von Akrosininhibitor dürfte damit auch beim Eber hormonabhängig sein.

Aus Nebenhodensekret und aus essigsauerm Nebenhodenspermenextrakt konnte ein relativ säurestabiler Akrosininhibitor angereichert werden.

Der Inhibitor liegt im Ebersperma sowohl in freier Form als auch im Komplex - gebunden an Akrosin - vor, da nach Säuredenaturierung des Akrosins die

Inhibitoraktivität anstieg.

Auf die Aktivität des Inhibitors aus Seminalplasma hatten Lagerung, Einfrieren und Auftauen keinen Einfluß.

Die Fraktionierung von Eberseminalplasma durch Gelchromatographie ergab im wesentlichen 2 Fraktionen von säurestabilem Inhibitor mit den Molekulargewichten um 12500 bzw. 6500. Weiter wurde eine hochmolekulare, säurelabile Inhibitorfraktion abgetrennt, die wahrscheinlich aus dem Blutserum stammt und deren Molekulargewicht bei 45000 liegt. Alle Fraktionen hemmen Plasmin, Trypsin und Akrosin und lassen sich somit im Hemmspektrum nicht unterscheiden.

Die proteinasehemmende Aktivität in Sperma und Genitalorganen vom Eber ist auf mehrere Proteinase-Inhibitoren zurückzuführen, die sich durch Molekulargewicht, Hemmspektrum und Säurestabilität unterscheiden lassen.

SUMMARY

Proteinase inhibitors from the boar genital tract tissue and from genital tract secretions were characterized. By determination of their inhibition capacity against acrosin and trypsin the distribution of the inhibitors were studied. The influence of orchitectomie on the inhibitor production was investigated.

Proteinase inhibitors from different parts of the genital tract of 18 mini-pig boars were determinated quantitatively. The highest inhibition activity (about 2700 mIU/ml) is found in the seminal vesicles. The inhibitors concentrations in epididymal and testicular tissues are about 100 times lower. The inhibitor concentration in prostatic and glandula bulbo-urethrales tissues ranges from 0 to 10 mIU/g tissue.

After orchitektomie a significant ($P \leq 0,01$) decrease of inhibitor activity in seminal plasma from 2676 mIU/ml ($\bar{x}$) to 499 mIU/ml ($\bar{x}$) was observed. Production of acrosin inhibitors might be dependent on hormonal status among boar too.

One of the inhibitors, present in boar ejaculates, seems to form a complex with acrosin. After denaturation of the enzyme by acids, the inhibitor concentration increases.

Storage, freezing and thawing of the seminal plasma has no influence on inhibitor activity. Gelchromatography of boar seminal plasma separates two main fractions of acid stable inhibitors with molecular weights of 12500 and 6500.

Another inhibitor fraction with a molecular weight of 45000, originating probably from blood serum, is separated. All fractions show no difference in their inhibition specificity. They inhibit plasmin, trypsin and acrosin.

The proteinase inhibitor activity of sperm and genital organs of boars could be reversed to several proteinase inhibitors, which differ from their molecular weight, localisation and (acid) stability.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ADAM, J., SCHAF, J.-H. und H. ENKE (1971)
Methoden der statistischen Analyse in
Medizin und Biologie
Gustav Fischer Verlag Stuttgart
- BEDFORD, J.M. (1969)
Morphological aspects of sperm
capacitation in mammals
In: Advances in the Biosciences 4: 35
Schering Symposium 1969, Pergamon Press
- BEDFORD, J.M. (1970 a)
Sperm capacitation and fertilization
in mammals
Biol. Reprod. 2: 143
- BEDFORD, J.M. (1970 b)
Sperm capacitation and fertilization
in mammals
Biol. Reprod. 2: 128
- BEDFORD, J.M., Gibian, H. und E.J. Plotz (1970)
Colloquium der Gesellschaft für biolo-
gische Chemie, Mosbach 1970
In: Mammalian Reprod. 21: 124
- BURUIANA, L.M. (1956)
Sur l'activité hyaluronidasique et
trypsinique du sperme
Naturwissensch. 43: 523

- CHANG, M.C. und D.M. HUNT (1956)
Effects of proteolytic enzymes on the
zona pellucida of fertilized and
unfertilized mammalian eggs
Exp. Cell. Res. 11: 479
- CHANG, M.C. (1958)
Capacitation of rabbit spermatozoa in
the uterus with special reference to
the reproductive phases of the female
Endocrinology 63: 619
- DETERMANN, H. (1967)
Gelchromatographie
Berlin, Heidelberg, New York
- DOTT, H.M., DINGLE, J.T. und H.B. FELL (1969)
Lysosomes in biology and pathology
North-Holland Publishing Company
Amsterdam, London,
- EDWARDS, R.G., BAVISTER, B.D. und P.C. STEPTOE (1969)
Early stages of fertilization in
vitro of human oocytes matured in
vitro
Nature, London, 221: 632
- FINK, E., SCHIESSLER, H., ARNHOLD, M.
und H. FRITZ (1972)
Isolation of a trypsin like enzyme
(acrosin) from boar spermatozoa
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353: 1633

FRITZ, H., TRAUTSCHOLD, I., HAENDLE, H.
und E. WERLE (1968)

Chemistry and biochemistry of
proteinase inhibitors from mammalian
tissue

Ann. N.Y. Acad. Sci. 146: 400

FRITZ, H., TRAUTSCHOLD, E. und E. WERLE (1970)

Methoden der enzymatischen Analyse
Bergmeyer ed. Weinheim

FRITZ, H., FINK, E. und R. MARX (1971)

Ansatzpunkte für eine antienzymatische
Kontrazeption

In: Sexualhormone und Blutgerinnung
XIV. Hamburger Symposium über Blutge-
rinnung

Eds.: Marx, R. und H.A. Thies

Verlag Schattauer, F.K., Stuttgart, N.Y.

FRITZ, H., FÖRG, B., FINK, E., MEIER, M.,
SCHIESSLER, H. und M. SCHIRREN (1972)

Humanakrosin: Gewinnung und Eigenschaften
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353: 1943

GADDUM, P. und R.J. BLANDAU (1970)

Proteolytic reaction of mammalian
spermatozoa on gelatin membranes

Science, N.Y. 170: 749

GROVE, D., BOLLWAHN, W. und R. MAHLER (1968)

Versuche zur Gewinnung und Tiefgefrier-
konservierung von Nebenhodenschwanzsperma
beim Eber

Dt. Tierärztl. Wschr. 75: 35

HAENDLE, H., FRITZ, H., TRAUTSCHOLD, I. und
E. WERLE (1965)

Über einen hormonabhängigen Inhibitor
für proteolytische Enzyme in männlichen
accessorischen Geschlechtsdrüsen und
im Sperma
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 343: 185

HAENDLE, H. (1969)

Über neue Proteinasen Inhibitoren
menschlichen und tierischen Ursprungs
Diss. Med. Klin. Univ. München (1969)

HAENDLE, H., INGRISCH, H. und E. WERLE (1970)

Zur Bedeutung des Proteasen-Inhibitors
des Säugerspermas bei der Befruchtung
und zur Frage der Identität mit dem
Dekapazitationsfaktor
Klin. Wschr. 48: 824

HAMNER, C.E., JONES, J.P. und N.J. SOJKA (1968)

Influence of the hormonal state of
the female on fertilizing capacity of
rabbit spermatozoa
Fert. Steril 124: 689

HATHEWAY, R.R. und E.F. HARTREE (1963)

Observation on the mammalian acrosome:
experimental removal of the acrosomes
from ram and bull spermatozoa
J. Reprod. Fert. 5: 225

MUDRA, A. (1958)

Statistische Methoden für landwirt-
schaftliche Versuche
Paul Parey, Berlin und Hamburg

PINSKER, M.C. und W.L. WILLIAMS (1967)

Properties of a spermatozoan
antifertility factor
Arch. Biochem. 122: 111

POLAKOSKI, K.L., ZANEVELD, L.D.J. und

W.L. WILLIAMS (1972)

Purification of a proteolytic enzyme
from rabbit acrosomes
Biol. Reprod. 6: 23

SCHEFELS, W. und R. STOLLA (-)

Resorption von Spermien im Neben-
hoden des Ebers
Zentrbl. Vet.Med. (in Druck)

SCHIESSLER, H. (1972)

Isolierung und Charakterisierung einer
trypsinähnlichen Proteinase (Akrosin)
aus Ebersperma und zweier Akrosininhi-
bitoren aus Humanspermaplasma
Dipl. Arb. Techn. Univ. München 1972

SCHIESSLER, H., FRITZ, H., ARNOLD, M., FINK, E.
und T. TSCHESCHE (1972)

Eigenschaften des Trypsin-ähnlichen
Enzyms (Akrosin) aus Eberspermien
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353: 1638

SCHILL, W.-B. (1973)

Methodische Untersuchungen zur Akrosin-
aktivität in menschlichen Spermatozoen
- Korrelation zwischen Akrosin und
Spermatozoendichte
Vortrag zur Jahrestagung 1973, Deut.
Ge. zum Stud. der Fert. und Steril.
13. - 14. April 1973 (Freiburg/Br.)

SCHILL, W.-B. und H.H. WOLF (unveröffentlicht)

SCHUMACHER, G.F.B. (1971)

Inhibition of rabbit sperm acrosomal
protease by human α_1 -antitrypsin
and other protease inhibitors
Contraception 4: 67

SOUPART, P. (1967)

Studies on the hormonal control of
rabbit sperm capacitation
J. Reprod. Fert. Suppl. 2: 49

STAMBAUGH, R. und J. BUCKLEY (1969)

Identification and subcellular
localization of the enzymes effecting
penetration of the zona pellucida by
rabbit spermatozoa
J. Reprod. Fert. 19: 423

STAMBAUGH, R., BRACKET, B.G. und
L. MASTROIANI (1969)

Inhibition of in vitro fertilization
of rabbit ova by trypsin inhibitors
Biol. Reprod. 1: 223

WALDSCHMIDT, M., HOFFMANN, B. und H. KARG (1966)

Untersuchungen über die tryptische
Enzymaktivität in Geschlechtssekreten
von Bullen
Zuchthyg. 1: 15

WERLE, E., TRAUTSCHOLD, I., HAENDLE, H. und
H. FRITZ (1968)

Physiologic, pharmacologic and clinical
aspects of proteinase inhibitors
Ann. N.Y. Acad. Sci. 146: 464

WILLIAMS, W.L., ROBERTSON, R.T. und
W.R. DUKELOW (1969)

Decapacitation factor and capacitation
In: Advances in the Biosciences 4: 61
Pergamon Press

YAMANE, Y. (1935)

Kausal-analytische Studien über die
Befruchtung des Kanincheneis
1. Die Dispersion der Follikelzellen
und die Ablösung der Zellen der Corona
radiata des Eies durch Spermatozoen
Cytologia 6: 233

ZANEVELD, L.D.J., SRIVASTAVA, P.N. und
W.L. WILLIAMS (1969)

Relationship of a trypsin-like enzyme
in rabbit spermatozoa to capacitation
J. Reprod. Fert. 20: 337

ZANEVELD, L.D.J. und W.L. WILLIAMS (1970)

A sperm enzyme that disperses the
corona radiata and its inhibition
by decapacitations factor
Biol. Reprod. 2: 363

ZANEVELD, L.D.J., SRIVASTAVA, P.N. und
W.L. WILLIAMS (1970)

Inhibition by seminal plasma of
acrosomal enzymes in intact sperm
Proc. Soc. exp. Biol. (N.4) 133: 1172

ZANEVELD, L.D.J., POLAKOSKI, K.L., ROBERTSON, R.T.
und W.L. WILLIAMS (1971 a)

Trypsin inhibitors and fertilization
In: Proc. Int. Res. Conf. of Proteinase
Inhibitors, Munich Nov. 1970, S. 236
Eds. H. Fritz, H. Tschesche
W. de Gruyter, Berlin

ZANEVELD, L.D.J., ROBERTSON, R.T., KESSLER, M.
und W.L. WILLIAMS (1971 b)

Inhibition of fertilization in vivo
by pancreatic and seminal plasma
trypsin inhibitors
J. Reprod. Fert. 25: 387

ZANEVELD, L.D.J., DRAGOJE, B.M. und
G.F.B. SCHUMACHER (1972 a)

Acrosomal proteinase and proteinase
inhibitor of human spermatozoa
Science, N.Y. 177: 702

ZANEVELD, L.D.J., POLAKOSKI, K.L. und
W.L. WILLIAMS (1972 b)

Properties of acrosin, a proteolytic
enzyme from rabbit sperm acrosomes
Biol. Reprod. 6: 30

LEBENS LAUF

Am 20. März 1947 wurde ich als Sohn des Buchhändlers Engelbert Weber und seiner Ehefrau Hildegard Weber, geb. Habbel in Regensburg geboren. Dort besuchte ich die Volksschule und am Albrecht Altdorfer Gymnasium erlangte ich 1967 das Zeugnis der Reife. Im Wintersemester des gleichen Jahres begann ich an der Universität München das Studium der Tiermedizin, das ich 1972 mit der tierärztlichen Prüfung abschloß. Im Dezember 1972 wurde mir die Bestallung als Tierarzt zuerkannt. Seit November 1972 war ich mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit beschäftigt. Im September 1973 heiratete ich Fräulein Margot Volland.

